UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1961 N° 196

Les applications de la réaction à l'hydroxylamine-chlorure ferrique en pharmacie

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

(Mention : PHARMACIE)

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1961

PAR

Henri SCHWAL

Pharmacien
Assistant de Chimie Biologique
Lauréat de la Faculté
Diplômé de Chimie Biologique, Bactériologie, Sérologie, Hydrologie, Phytopharmacie

MEMBRES DU JURY

MM. VINCENT (D.), *Président*
BRUSTIER (V.)
CAUJOLLE (F.)
VALDIGUIÉ (P.) *Assesseurs*
DOUSTE-BLAZY (L.)
BREUILLAUD, *Suppléant.*

TOULOUSE
IMPRIMERIE TOULOUSAINE
Vve R. LION
16, Rue Lakanal, 16
1961

SCHWAL (Henri).

Les applications de la réaction à l'hydroxylamine-chlorure ferrique en pharmacie.

Toulouse, 1961, Impr. Toulousaine, in-8°, 96 pages.

Thèse Médecine, Toulouse, 1961, n° 196.

SCHWAL (Henri).

Les applications de la réaction à l'hydroxylamine-chlorure ferrique en pharmacie.

Toulouse, 1961, Impr. Toulousaine, in-8°, 96 pages.

Thèse Médecine, Toulouse, 1961, n° 196.

SCHWAL (Henri).

Les applications de la réaction à l'hydroxylamine-chlorure ferrique en pharmacie.

Toulouse, 1961, Impr. Toulousaine, in-8°, 96 pages.

Thèse Médecine, Toulouse, 1961, n° 196.

SCHWAL (Henri).

Les applications de la réaction à l'hydroxylamine-chlorure ferrique en pharmacie.

Toulouse, 1961, Impr. Toulousaine, in-8°, 96 pages.

Thèse Médecine, Toulouse, 1961, n° 196.

LES APPLICATIONS DE LA REACTION

A

L'HYDROXYLAMINE-CHLORURE FERRIQUE

EN PHARMACIE

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN. . . .. MM. Lazorthes.
ASSESSEUR. . . .. Delas.
DOYENS HONORAIRES..... Gorse, Calvet, Lefebvre, Brustier.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Vallois, Clermont, Ducuing, Ribaut, Nanta, Tapie.

SECTION MEDECINE

PROFESSEURS

Clinique médicale..... MM. Mériel,
Clinique médicale..... Gadrat.
Clinique chirurgicale et Gynécologie. . . .. Fabre (P.).
Clinique chirurgicale et du Cancer. . . .. Grimoud.
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie..... Virenque.
Clinique des Maladies cutanées et syphilitiques..... Bazex.
Clinique des Maladies de la Tuberculose et Pathologie interne. . . .. Morel.
Clinique des maladies des voies urinaires..... Lhez.
Clinique médicale infantile et Puériculture. . . .. Sorel (R.).
Clinique de Neurologie et Psychiatrie. . . .. Riser.
Clinique obstétricale..... Guilhem.
Clinique odonto-stomatologique. . . .. Cadenat.
Clinique ophtalmologique.... Calmettes.
Clinique O.R.L. et de Chirurgie maxillo-faciale..... Calvet.
Clinique traumatologique des membres. . . .. Rieunau.
Accouchement et Obstétricie sociale. . . .. Pontonnier.
Anatomie. . . .. Lazorthes.
Anatomie appliquée..... Poulhès.
Anatomie pathologique..... Fabre (J.).
Bactériologie, Hygiène, Médecine sociale..... Andrieu.
Chimie biologique..... Valdiguié (P.).
Electro-radiologie. . . .. Marquès.
Embryologie. . . .. Broussy.
Histologie. . . .. Bimes.
Hydrologie thérapeutique et Climatologie. . . .. Darnaud.
Médecine légale et du Travail Planques.
Médecine sociale..... Bounhoure.
Parasitologie. . ..... Boulsset.
Pathologie chirurgicale..... Dambrin.
Pathologie générale et Médecine expérimentale..... Sendrail.
Physico-Chimie. . . .. Auvergnat.
Physiologie. . ..... Soula.
Physiologie appliquée et Pharmacologie. . . .. Baisset.
Physique biologique et médicale. . . .. Bugnard.
Propédeutique médicale ..... Géraud.
Thérapeutique. . . .. Dardenne.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie gén. et comparée.. MM. Coulouma.
Pathologie médicale..... Laporte J.
Bactériologie. . . .. Mme Enjalbert.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Physiologie. . . .. MM. Laporte Y.
Biochimie médicale..... Douste-Blazy
Physique médicale..... Bru.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie pathologique .... MM. Boussou.
Histologie et Embryologie... Planel.
Parasitologie ..... Ruffié (J.).
Physiologie . ..... Montastruc.

AGREGES

Pathologie médicale..... MM. Monnier.
— ..... Ribaut.
— ..... Delaude.
— ..... Calazel.
Pathologie chirurgicale ..... MM. Enjalbert.
— ..... Ficat.
— ..... Pasquié.
— ..... Souquet.
Médecine légale et Médecine du Travail ..... MM. Grèzes-Rueff.
Odonto-stomatologie. . ..... Cadenat (H.).
Pédiatrie. . ..... Bardier (A.).
Rhumatologie. . . .. Ruffié (R.).

AGREGES LIBRES

Anatomie. . ..... MM. Thomas.
Obstétrique. . . .. Déodati.
Oto-Rhino-Laryngologie. . .. Claux.
Pathologie chirurgicale..... Dieulafé.

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique, Cryptogamie..... Mme Dulucq-Mathon
Chimie analytique, Toxicologie et Hygiène industrielle. MM. Bourbon.
Chimie pharmaceutique..... Blanc.
Zoologie. . . .. Delas.
Matière médicale..... Vincent.
Pharmacie chimique et Pharmacodynamie. . . .. Caujolle.
Pharmacie galénique..... Stanislas.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie. . . .. M. Couturier.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Sciences naturelles..... Mlle Meynier.
M. Roux.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Sciences naturelles..... MM. Breuillaud.
Sciences physiques..... Pitet.

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire principal..... M. Roche.
Secrétaire. . . .. Mme Laffont.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération en date du 12 mai 1891.)

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1961 N° 196

Les applications de la réaction à l'hydroxylamine-chlorure ferrique en pharmacie

THESE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

(Mention : PHARMACIE)

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1961

PAR

Henri SCHWAL

Pharmacien
Assistant de Chimie Biologique
Lanréat de la Faculté
Diplômé de Chimie Biologique, Bactériologie, Sérologie, Hydrologie, Phytopharmacie

MEMBRES DU JURY

MM. VINCENT (D.), *Président*
BRUSTIER (V.)
CAUJOLLE (F.)
VALDIGUIÉ (P.) } *Assesseurs*
DOUSTE-BLAZY (L.)
BREUILLAUD, *Suppléant.*

TOULOUSE
IMPRIMERIE TOULOUSAINE
Vve R. LION
16, Rue Lakanal, 16
1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MA FEMME

A MON FILS - A MA FILLE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546524_0033

A MES PARENTS

Je leur dois tout. Ma réussite a été la récompense bien légère de leurs lourds sacrifices. Rien ne pourra jamais traduire mon amour et mon immense gratitude.

A MES BEAUX-PARENTS

LE DOCTEUR ET MADAME DEUMIÉ

Ils m'ont accueilli comme un fils. Ils savent mon affection pour eux.

A TOUS LES MIENS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur VINCENT

Professeur de Matière médicale

Vous avez inspiré et guidé ce travail, nous témoignant toujours une grande bienveillance et la plus large indulgence ; nous sommes sensible à l'intérêt que vous nous portez.

Il serait bien difficile de dire en si peu de mots notre profonde admiration et toute notre gratitude.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

Monsieur le Professeur BRUSTIER

Doyen honoraire
Commandeur de la Légion d'Honneur

Vous nous avez toujours témoigné une bienveillante attention au cours de nos études. C'est un grand honneur pour nous de vous voir siéger à notre Jury de thèse.

Monsieur le Professeur CAUJOLLE

Professeur de Pharmacie
Membre correspondant de l'Académie de Médecine
Inspecteur principal de Pharmacie
Officier de la Légion d'Honneur

Suivre votre brillant enseignement fut pour nous un plaisir, et nous avons été particulièrement honoré de l'intérêt que vous n'avez jamais cessé de nous témoigner dès la première année de nos études.

Monsieur le Professeur VALDIGUIÉ

Professeur de Chimie biologique

Vous avez toujours manifesté à notre égard un intérêt très bienveillant et nous avez fait le grand honneur de nous prendre comme assistant dans votre Service.

Veuillez trouver ici le témoignage de notre respectueux attachement.

Monsieur le Professeur DOUSTE-BLAZY

Professeur sans chaire de Chimie biologique

Nous avons eu la grande joie d'entrer comme assistant dans le Service de notre Maître, Monsieur le Professeur VALDIGUIÉ, où nous aurons l'honneur de travailler sous votre direction.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer nos remerciements et l'assurance de notre profond respect.

Monieur le Professeur BREUILLAUD

Maître de Conférences agrégé de Microbiologie

Il nous est très agréable de vous remercier de l'accueil bienveillant que vous nous avez toujours réservé et de l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger à notre Jury de thèse.

Monsieur Raymond SALAS

Pharmacien

A la faveur de cette année de stage, vous avez été plus qu'un maître et êtes devenu un ami.

Soyez remercié pour tous les conseils que vous n'avez jamais cessé de nous donner.

Introduction

Que ce soit pour identifier une substance chimique, pour en faire la diagnose, l'étude analytique, ou en mesurer l'état de conservation, le laboratoire dispose de nombreuses réactions pour l'aider dans cette tâche.

Actuellement, les méthodes d'analyses sont de plus en plus poussées ; elles nécessitent un appareillage toujours plus compliqué et spécialisé permettant d'obtenir une très grande précision dans le dosage, mais la rançon de cette spécificité est d'amener les inconvénients suivants :

— méthodes souvent très délicates,

— appareillage extrêmement important, précis, et, partant, coûteux,

— réactifs nombreux, de préparation parfois longue et souvent difficile, et de conservation quelquefois limitée.

Aussi, le chimiste, comme le chercheur, sera-t-il heureux d'avoir à sa disposition une méthode d'étude simple, efficace, d'un maniement et d'un emploi rapides, utilisant des réactifs courants et faciles à préparer. C'est le cas de la réaction à l'hydroxylamine-perchlorure de fer ou réaction hydroxamique. Certes, cette réaction, découverte par Lossen [30-31] (1869), a déjà fait l'objet de nombreux travaux et de quelques applications pratiques (Feigl [11], Anger et Frehden, Lippmann

et Tutle [27-28], Hill [18-19], Chantrenne [7], Hestrin [17], Bauer et Hirsch [5], Jarrier et Polonowski [24], Fink [12], Frèrejacques [16], Vincent [47 à 54], Wachsmuth et Koeckoven [57-58], S. Seifter et Galop [45].

Cependant, il est certain que son usage est encore trop peu répandu et qu'elle est susceptible de rendre des services encore beaucoup plus grands. Aussi, selon les indications de M. le professeur D. Vincent, avons-nous eu pour but, dans ce travail, de rechercher et d'étudier tout spécialement les applications de cette réaction dans la pratique pharmaceutique, applications encore à peu près inusitées dans le domaine de l'essai des médicaments, de leur identification, de leur usage et du contrôle de leur conservation.

PLAN D'ÉTUDE

Dans un premier chapitre, nous étudierons le mécanisme de cette réaction et la technique employée dans nos recherches personnelles.

Dans les chapitres suivants, nous ferons l'exposé de nos travaux dans les domaines ci-dessous :

1. *Alcaloïdes.*
2. *Glucosides cardiotoniques.*
3. *Antibiotiques et notamment la pénicilline.*
4. *Hormones stéroïdes.*
5. *Essences.*
6. *Esters phénoliques et dérivés salicylés.*
7. *Esters d'acides gras.*
8. *Substances diverses. Esters choliniques.*

CHAPITRE PREMIER

STRUCTURE DES ACIDES HYDROXAMIQUES [1], LEURS PROPRIÉTÉS. MÉCANISME DE LA RÉACTION A L'HYDROXYLAMINE. TECHNIQUE UTILISÉE.

A. — STRUCTURE.

La copulation de l'hydroxylamine avec certains composés, et tout particulièrement les esters, donne des acides hyydroxamiques. Ceux-ci constituent une classe de substances connues depuis fort longtemps. En effet, en 1869 déjà H. LOSSEN [30-31] observa que l'hydroxylamine réagissait avec l'oxalate d'éthyle, en donnant un sel d'hydroxylamine d'un acide, qu'on peut représenter par la formule :

$$\begin{array}{l} CO - NHOH \\ | \\ CO - NHOH \end{array}$$

LOSSEN [30-31] appela ce composé : l' « acide oxalhydroxamique », et nota qu'il pourrait être un des premiers éléments d'une nouvelle classe de corps organiques. Ces corps ont reçu depuis de nombreuses appli-

(1) Nous avons puisé l'essentiel de ces données chimiques sur les acides hydroxamiques dans la thèse de F. MATHIS [34], que nous remercions d'avoir bien voulu s'intéresser à notre travail.

cations industrielles et analytiques. C'est ainsi que deux composés naturels apparentés aux acides hydroxamiques, l'acide aspergillique et la nocardamine, et découverts récemment, sont doués de propriétés bactéricides.

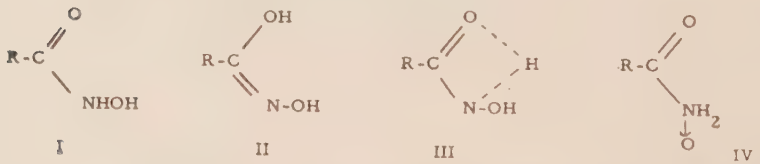
On peut envisager plusieurs schémas pour étudier la structure du groupement fonctionnel des acides hydroxamiques :

Schéma 1 : N hydroxyamide ou acide hydroxamique proprement dit.

Schéma 2 : oximinoalcool ou acide hydroxamique.

Schéma 3 : mésohydrique d'Oddo [37-38].

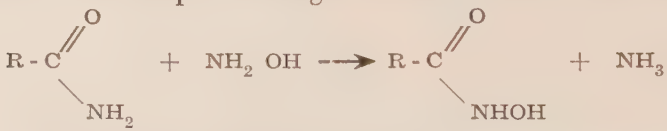
Schéma 4 : amide N oxyde.



Les structures 1 et 2 semblent être les plus généralement adoptées. En effet :

1° Les acides hydroxamiques peuvent être obtenus par action de l'hydroxylamine sur les esters, comme les amides le sont par action de l'ammoniac ou des amides primaires sur les mêmes esters.

2° L'hydroxylamine réagit sur certains amides pour former des acides hydroxamiques. Il y aurait dans cette réaction un simple échange fonctionnel :



3° On a pu réaliser par voie enzymatique la transformation d'un amide en un acide hydroxamique. C'est ainsi qu'il existe dans le cerveau de mouton un enzyme qui, en présence d'ammoniaque, transforme l'acide glutamique en glutamine, laquelle, en présence d'hydroxylamine, se transforme en acide glutamohydroxamique. Il

apparaît, dans ce passage de l'amide à l'acide hydroxamique, une analogie certaine avec les réactions de transamidation et une analogie de structure entre les acides hydroxamiques et les amides.

4° Un fait supplémentaire rapproche les acides hydroxamiques des hydroxylamines R - NHOH ; en effet, les hydroxylamines et les acides hydroxamiques donnent avec $FeCl_3$ la même réaction colorée, alors que la structure oximinoalcool (schéma 2), qui rapprocherait les acides hydroxamiques des oximes R - CH = NOH, ne permet pas la réaction colorée avec le perchlorure de Fe.

5° On ne peut prendre comme schéma de structure la formule mésohydrique d'Oddo. En effet, cette structure résulterait d'une « résonance » entre une forme :

dans lesquelles l'atome d'azote et un atome d'H échangent une liaison hydrogène. Or, l'écartement des deux atomes intéressés est trop grand pour que cette liaison puisse s'établir entre eux.

6° On a été amené à choisir pour véritable structure entre le schéma N hydroxyamide et le schéma oximinoalcool. Ce sont les travaux de Lossen [30-31], par benzoylations successives des acides hydroxamiques, et ceux de Mathis [34], par étude spectrographique aux infra-rouges de quelques acides hydroxamiques, comme les acides suivants :

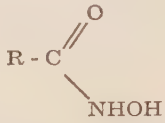
— acides propionhydroxamiques :

$$CH_3 - CH_2 - CO - NHOH$$

— acides phényl-3-propionhydroxamiques :

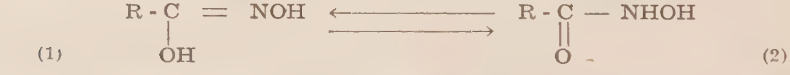
$$C_6H_5 - CH_2 - CH_2 - CONHOH$$

qui ont montré que les acides hydroxamiques possèdent une structure suivant le schéma 1 :



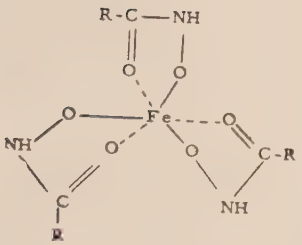
B. — Propriétés des acides hydroxamiques et mécanisme de la réaction.

L'hydroxylamine peut donner avec de nombreux corps des acides carboxylhydroxamiques, dits plus simplement hydroxamiques, mais c'est encore avec les esters que cette réaction donne les meilleurs résultats [1, 4, 5, 6, 33, 11, 12, 14, 15, 21, 22, 23, 17, 18, 25, 26, 36, 39, 40, 43, 46, 55, 56] ; cependant, les anhydrides [8], les chlorures d'acides [11], les lactones [29, 32, 55, 58, 63], les lactames [13, 17], se comportent comme les esters. Ces acides hydroxamiques peuvent être représentés, d'après M. Pesez [41], sous deux formes : l'une d'hydroxy-oxime [1], l'autre de N hydroxy-amide [2]. Les spectres d'absorption montrent cependant que les acides hydroxamiques correspondent aux amides 2.



(1) (2)

Les aldéhydes [4] sont susceptibles de réagir comme les esters, de même que les alcools après acétylation par le chlorure d'acétyle [3, 61]. Les propriétés du groupement fonctionnel acide hydroxamique dépendent de l'oxhydrile lié à l'azote. Cet oxhydrile possède un caractère acide faible et donne des complexes colorés avec des ions métalliques. Feigl [11] et Davidson [10] ont appliqué la colorimétrie à la formation d'acides hydroxamiques en mettant à profit la teinte rouge que fournissent ces dérivés avec le fer trivalent. C'est ainsi que, d'après R. F. Weinland et G. Baier [61], on attribue au complexe ferrique de l'acide benzhydroxamique la structure suivante :



Avec les sels ferriques, on obtient une coloration variant du rouge cerise au rouge brun. Les acides acétyl-hydroxamiques donnent une coloration rouge ; les acides benzoyl-hydroxamiques une coloration violette. On peut donc faire la diagnose d'un corps comme un ester, en le transformant par action de l'hydroxylamine en acide hydroxamique, cet acide étant caractérisé par la réaction avec le perchlorure de fer.

On peut, de plus, ainsi que l'a fait THOMPSON [46], utiliser cette réaction comme méthode de dosage, car l'intensité de la coloration du complexe ferrique formé est proportionnelle à la concentration d'hydroxamate, donc à la quantité d'ester présente dans la prise d'essai avant la réaction.

C. — TECHNIQUE UTILISÉE.

La technique que nous avons utilisée est inspirée de celle donnée par HESTRIN [17] et comporte quelques modifications apportées par D. VINCENT, G. SEGONZAC et M. C. VINCENT [47] dans leur travail sur son application au dosage de l'acétylcholine.

1° *Réactifs.*

a) Solution de chlorhydrate d'hydroxylamine à 13,9 % dans l'eau, conservée à la glacière.

b) NaOH à 3,5 M.

c) HCl 4 M.

d) Solution de $FeCl_3$, 0,37 M dans HCl 0,1 M.
e) Eau distillée ou alcool de degré variable suivant le corps dont on doit faire la diagnose ou le dosage.

2° *Technique.*

Pour nos essais expérimentaux, les produits purs ont été mis en solution, soit dans l'eau distillée, soit dans l'alcool, de façon à obtenir des dilutions variant de 1 à 5 ‰. Nous indiquerons, pour chaque corps étudié, le solvant et la dilution choisis.

La réaction est faite sur 1 cm^3 de solution (soit 1 ou 5 mg).

On ajoute 0,4 cm^3 d'une solution alcaline d'hydroxylamine (la solution d'hydroxylamine est additionnée au moment de l'emploi de deux volumes de soude 3,5 M).

On mélange, puis on ajoute, après un temps variable suivant le corps étudié, 0,3 cm^3 de HCl 4 M, puis 0,2 cm^3 de solution de $FeCl_3$ 0,37 M dans HCl 0,1 M. Cette notion de temps pendant lequel on laisse l'hydroxylamine agir sur le corps à doser est très importante. En effet, certains corps forment très rapidement avec l'hydroxylamine un acide hydroxamique, mais pour d'autres, comme l'atropine, la réserpine, l'expérience nous a montré que le temps de la réaction était plus long, la formation de l'acide hydroxamique ne se faisant que lentement.

C'est pourquoi dans nos expériences, les résultats que nous livrons ne sont valables que pour des conditions expérimentales bien définies ; ils peuvent être bien différents quand le temps de contact avec l'hydroxylamine alcaline est augmenté.

Après l'addition de la solution chlorhydrique de perchlorure de fer, on dilue, soit avec 5 cm^3 d'eau distillée, soit avec 5 cm^3 d'alcool à 70 degrés, quand l'addition d'eau distillée risque d'amener une certaine turbidité

de la solution (essence de lavande, par exemple). Là aussi, nous indiquerons, pour chaque chapitre, le diluant utilisé.

3° *Lecture.*

La lecture colorimétrique est faite indifféremment, soit à l'électrophotomètre de Meunier, soit au photocolorimètre électronique Jobin-Yvon, filtre vert 520 mμ, cuve 1 cm.

En général, la coloration reste stable et la lecture de nombreux essais simultanés peut être effectuée dans les quinze minutes sans aucune difficulté.

Chapitre II

ALCALOIDES

La réaction à l'hydroxylamine-chlorure ferrique paraît évidemment intéressante à étudier dans le cas des alcaloïdes. Certains en effet présentant la structure d'esters (alcaloïdes atropiniques, cocaïne, aconitine, etc.), remplissent parfaitement toutes les conditions pour donner des hydroxamates avec une grande facilité.

Mais, désirant ne pas nous limiter aux alcaloïdes, pour l'étude desquels cette réaction est *a priori* intéressante, nous avons jugé utile de présenter ici un travail systématique portant sur les alcaloïdes les plus divers, afin d'établir par ce moyen des données numériques correspondant à l'intensité de la réaction et pouvant éventuellement aider à la diagnose de certains alcaloïdes et surtout à leur dosage et à la mise en évidence des altérations par hydrolyse de leurs solutions.

Technique.

Nous avons utilisé, à quelques variantes près, la méthode préconisée par Hestrin [17], modifiée sur certains points par D. Vincent [47] dans l'application faite à propos de l'acétylcholine.

La prise d'essai d'alcaloïde (sel d'alcaloïde ou base dissoute dans l'eau distillée avec le minimum d'HCl), 1 cm3 de solution, est additionnée de solution alcaline d'hydroxylamine, 0,4 cm^3, puis on passe en milieu acide par addition d'HCl 4 M : 0,3 cm^3, le temps d'attente après l'addition de la solution alcaline d'hydroxylamine étant d'environ une minute, on ajoute enfin la solution ferrique, 0,2 cm^3, on dilue par 5 cm^3 d'eau distillée.

La lecture est faite à l'électrophotomètre de Meunier ou au spectrophotomètre électronique Jobin-Yvon, filtre vert 520 mμ, cuve de 1 cm.

Dans les cas de réaction très intense, on utilise 0,5 cm^3 de solution ferrique.

I. — ALCALOIDES A FONCTION ESTER

Résultats.

Nous donnons, dans le tableau suivant, les résultats obtenus, pour chaque alcaloïde étudié, en degrés électrophotométriques Meunier, et en même temps la correspondance en densités optiques. Ces résultats se rapportent, d'une part, à l'intensité de coloration obtenue sur une prise d'essai de même poids (5 mg) de chaque alcaloïde-base, et, d'autre part, sur 1 cm^3 de solution 0,01 M, le temps de contact avec la solution alcaline d'hydroxylamine étant approximativement d'une minute. Nos résultats correspondent à la conduite de la réaction, dans les conditions précédemment indiquées. Ils peuvent être différents pour certains alcaloïdes, lorsqu'on utilise l'alcaloïde en solution alcoolique ou lorsque le temps de contact avec la solution alcaline d'hydroxylamine est plus prolongé, par exemple : trente minutes.

TABLEAU I

INTENSITÉ DE LA RÉACTION COLORÉE

ALCALOÏDES ÉTUDIÉS (1)	sur 5 mg d'alcaloïde-base		sur 1 cm³ de solution 0,01 M	
	degrés Meunier	D.O.	degrés Meunier	D.O
Aconitine	290	0,90	385	1,19
Apoatropine	135	0,41	81	0,23
Arécoline	430	1,39	180	0,55
Atropine	31	0,09	20	0,06
Benzoylecgonine	400	1,21	230	0,71
Cassaïne	150	0,46	110	0,34
Cocaïne	535	1,65	360	1,11
Corynanthine	0	0	0	0
Delcaïne	610	1,89	400	1,24
Delphinine	15	0,05	18	0,06
Ésérine (2) [Physostigmine]	2400	7,75	1475	4,57
Génésérine (2)	1725	5,34	1250	3,87
Génatropine	65	0,20	40	0,12
Génohyoscyamine	65	0,20	40	0,12
Génoscopolamine	70	0,21	50	0,15
Héroïne	710	2,20	600	1,86
Homatropine	26	0,08	15	0,04
Hyoscyamine	31	0,09	20	0,06
Protovératrine A	330	1,02	550	1,70
— B	338	1,04	550	1,70
Pseudoaconitine	51	0,15	65	0,20
Raubasine	0	0	0	0
Réserpine	< 10	< 0,03	< 10	< 0,03
Serpentine	0	0	0	0
Scopolamine	60	0,19	50	0,15
Tropacocaïne	516	1,60	270	0,84
Vératrine	71	0,22	82	0,25
Yohimbine	10	0,03	< 10	0,03

(1) Nous adressons nos remerciements à MM. les Directeurs des Laboratoires : ROQUES, AMIDO, BOYER, UCLAF ROUSSEL (Paris), LABATEC (Genève), FLUKA (Buchs), ainsi qu'à M. le docteur Raymond HAMET, qui nous ont procuré très obligeamment la plupart de ces alcaloïdes.

(2) Coloration totale sans déduction de la coloration donnée avec la soude sans hydroxylamine.

Ces résultats indiquent bien les grandes différences d'intensité de coloration obtenues avec les divers alcaloïdes-esters. Dans tous les cas, les teintes obtenues sont rouges, plus ou moins violacées. Par des mesures sur des concentrations diverses d'alcaloïdes, nous avons vu aussi que l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration, du moins en général, lorsque la concentration ne dépasse pas 5 mg dans la prise d'essai de 1 cm^3. Encore la proportionnalité n'est-elle pas entièrement respectée dans le cas des alcaloïdes donnant les colorations les plus intenses.

Il convient de ne pas considérer toutefois les chiffres donnés ici comme des valeurs absolues, car l'intensité des teintes peut varier considérablement selon le temps de contact avec l'hydroxylamine alcaline pour certains alcaloïdes tout au moins, ainsi que nous l'indiquons plus loin à propos de la pseudoaconitine, de la delphinine, de certains alcaloïdes atropiniques et de la vératrine officinale.

L'intensité de la réaction est maximum dans le cas de l'ésérine, puis de la génésérine. Se classent par ordre d'intensité décroissante : l'héroïne, la cocaïne, la delcaïne, la tropacocaïne, l'arécoline, la benzoylecgonine, les protovératrines A et B, l'aconitine, la cassaïne, l'apoatropine ; enfin, avec une intensité bien moindre, la vératrine officinale, la pseudoaconitine, la génoscopolamine, la génatropine et la génohyoscyamine, la scopolamine, l'atropine, l'hyoscyamine, l'homatropine, la delphinine.

Comme on pouvait le prévoir, ce sont les alcaloïdes à deux fonctions esters qui, en général, donnent les colorations les plus fortes, tandis que les autres alcaloïdes-esters étudiés donnent, pour la plupart, une coloration nettement moins intense. D'autres donnent des colorations très faibles et pratiquement nulles : yohimbine et corynanthine, réserpine, serpentine, raubasine et autres esters. Signalons cependant que la réserpine qui, en solution aqueuse, donne une coloration pratiquement

négligeable, donne aussi une réaction relativement intense en milieu alcoolique, même après contact de une à deux minutes.

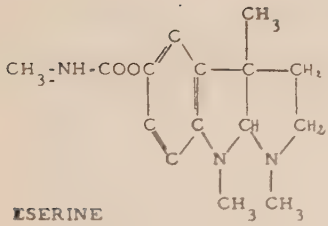
On observe aussi que, dans nos conditions expérimentales, les protovératrines provoquent une réaction beaucoup plus intense que la vératrine officinale et la pseudoaconitine une coloration environ huit fois plus faible que l'aconitine, la delphinine donne aussi une coloration très faible. L'explication réside sans doute dans une hydrolyse beaucoup moins rapide de la pseudoaconitine, de la delphinine et de la vératrine officinale par rapport respectivement à l'aconitine et à la protovératrine. En effet, des colorations beaucoup plus intenses que dans nos essais standards sont obtenues, si on laisse préalablement en contact plus longtemps (trente minutes au lieu d'environ deux minutes), avec l'hydroxylamine alcaline avant l'addition d'HCl et de chlorure ferrique.

Notons que nos résultats sont en accord avec ceux obtenus récemment (1959) par Wachsmuth et Koeckoven [59-60] pour l'aconitine, l'héroïne et la cocaïne, seuls alcaloïdes étudiés par ces auteurs.

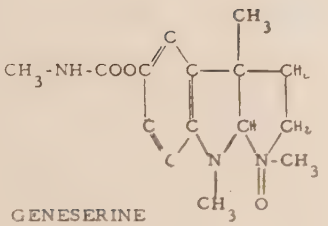
Etude spéciale de quelques alcaloïdes-esters.

1° *Ésérine et génésérine.*

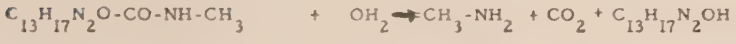
Le cas de l'ésérine et de la génésérine appelle des observations particulières. D'abord, on remarque l'intensité extraordinaire de la coloration obtenue. Ensuite, en étudiant la réaction de plus près, on s'aperçoit qu'une coloration rouge importante est aussi donnée directement par la soude en l'absence d'hydroxylamine, coloration qui augmente par le chlorure ferrique et qu'on peut sans doute rapporter à la formation d'éséroline par hydrolyse de la fonction ester méthylcarbamique.



ESERINE



GENESERINE



METHYLAMINE ESEROLINE

Dans le cas où l'on ajoute à la solution d'ésérine l'hydroxylamine alcaline, on n'observe pas de coloration en milieu alcalin, mais seulement apparaît une coloration rose lorsqu'on acidifie par HCl, coloration qui devient extrêmement intense par le chlorure ferrique. Cette coloration se développe progressivement et, dans nos mesures, nous avons attendu cinq minutes avant de diluer par l'eau distillée. L'intensité de cette coloration dépasse alors de beaucoup celle donnée dans le témoin sans hydroxylamine. Les deux colorations, de teinte d'ailleurs assez différente, l'une plus violacée, l'autre plus orangée, sont donc différentes dans leur mécanisme. Des dérivés colorés déjà décrits y participent certainement, tels la rubrésérine et le bleu d'ésérine, mais une étude plus approfondie, à laquelle il ne nous est pas possible de nous livrer ici, serait nécessaire pour en décider.

On peut même se demander si la coloration provoquée par l'hydroxylamine et $FeCl_3$ répond ici à la réaction hydroxamique classique. En effet, il ne le semble pas, étant donné que, selon quelques essais effectués, l'ester méthylcarbamate d'éthyle traité de la même façon, ne donne lieu à aucune coloration notable. On peut donc estimer que le dérivé hydroxamique de l'acide méthylcarbamique, ou bien ne se forme pas, ou bien ne

donne pas de complexe ferrique coloré, l'hydrolyse ne se faisant pas au niveau de l'ester ; on obtient en effet du CO_2 et de la méthylamine. Il est vraisemblable qu'il en est de même dans le cas de l'ésérine.

Nous avons procédé à une étude cinétique de la réaction à l'hydroxylamine $Fe\,Cl_3$ sur une solution aqueuse d'ésérine (base dissoute avec le minimum d'HCl) à 1 ‰. Pour cela, à 1 cm^3 de la solution d'ésérine à 1 ‰, nous avons ajouté 0,4 cm^3 de la solution alcaline d'hydroxylamine en laissant des temps de contact de deux, cinq, dix et quinze minutes, puis 0,3 cm^3 d'HCl 4 M et 0,5 cm^3 de solution de chlorure ferrique et, enfin, après cinq minutes, 5 cm^3 d'eau distillée ; les chiffres obtenus nous ont permis de tracer le graphique ci-contre.

A l'examen de ces courbes, on s'aperçoit que si la coloration totale de l'ésérine en présence d'hydroxylamine alcaline ne varie pratiquement que dans d'étroites limites, la coloration obtenue avec le témoin sans hydroxylamine croît dans des proportions notables (de l'ordre de 150 degrés Meunier — D.O = 0,47) quand on laisse agir la soude quinze minutes.

La génésérine se distingue de l'ésérine par une intensité de la réaction colorée nettement moindre, et aussi par une teinte brun vert des essais témoins effectués par la soude sans hydroxylamine, avec addition ultérieure d'HCl et de $Fe\,Cl_3$, alors que dans le cas de l'ésérine la teinte est rouge intense.

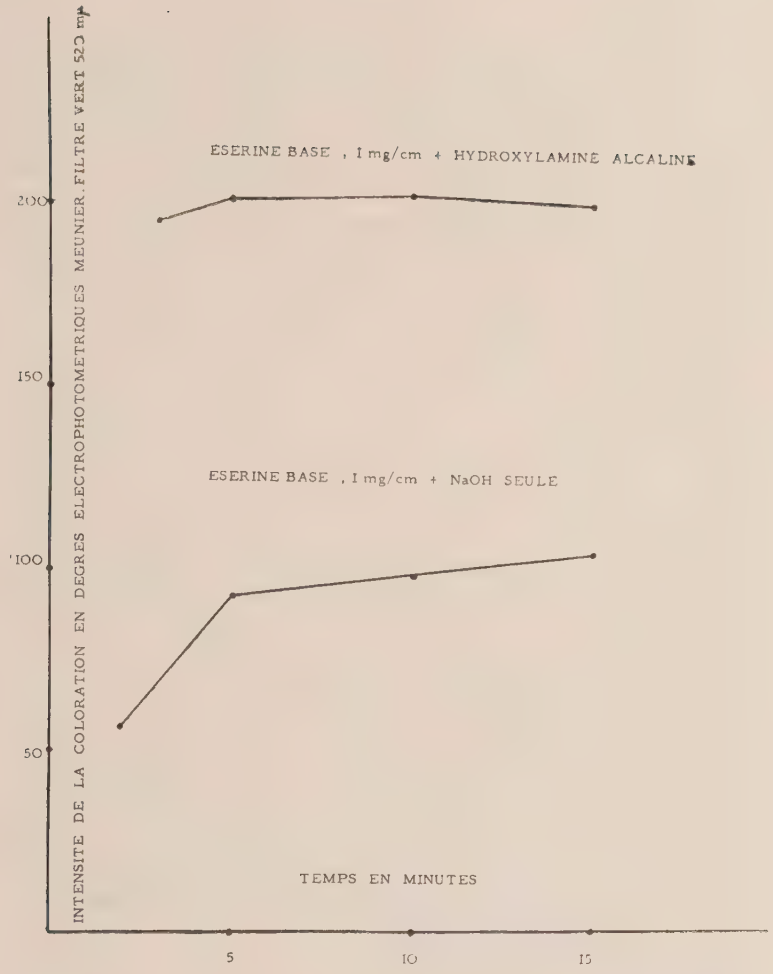


FIG. 1.

2° *Alcaloïdes atropiniques.*

Les esters du groupe du tropanol ne donnent, dans nos conditions standards, qu'une coloration faible ; cependant, il nous a paru utile d'en approfondir l'étude à diverses concentrations et en modifiant la technique. Nos essais sur ce groupe des alcaloïdes tropiques ont porté sur l'atropine (sulfate et base dissoute dans le minimum d'HCl), sur l'hyoscyamine (sulfate et base), la scopolamine (BrH), l'apoatropine (BrH), l'homa-

tropine (BrH) et les génalcaloïdes : génatropine (ClH), génohyoscyamine (ClH) et génoscopolamine (BrH).

L'alcaloïde sous forme de sel (ou de base additionnée du minimum d'HCl) est mis en solution aqueuse, de façon à obtenir des concentrations allant de 0,02 M à 0,002 M, la réaction est faite sur 1 cm^3 de solution

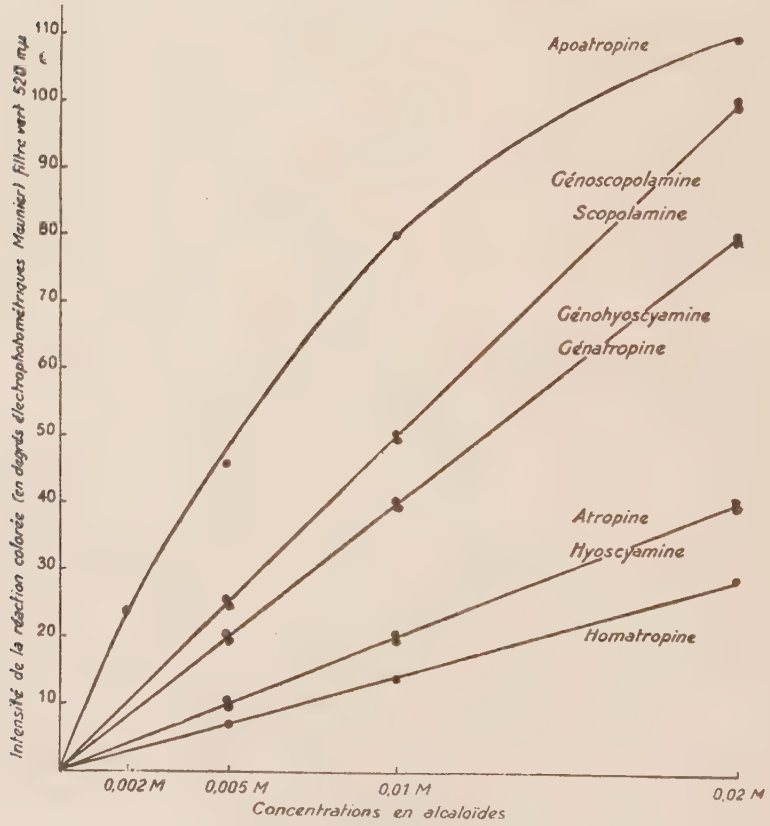


FIG. 2.

qu'on additionne des réactifs déjà cités, le temps pendant lequel on laisse agir l'hydroxylamine alcaline est d'environ deux minutes, l'intensité de la coloration rouge obtenue mesurée à l'électrophotomètre, filtre vert 520 mμ, cuve de 1 cm, est indiquée par les courbes du graphique.

L'atropine et l'hyoscyamine donnent une droite régulière, mais la coloration reste faible (de l'ordre de 40 degrés Meunier pour M/50, soit une D.O. de 0,12 dans le vert), la scopolamine provoque une réaction plus intense, environ 100 degrés Meunier pour M/50.

L'apoatropine se distingue par une réaction colorée encore plus intense jusqu'à la concentration M/100, toutefois, à une concentration plus forte, la courbe s'infléchit et la proportionnalité n'est plus maintenue. Il faut signaler d'ailleurs que lors de l'addition à la solution d'apoatropine de la solution alcaline d'hydroxylamine, il se forme un précipité qui persiste, alors que pour les autres alcaloïdes de ce groupe il disparaît assez rapidement. Ce n'est que l'acidification ultérieure qui en conditionne la disparition.

A l'opposé, l'homatropine donne l'intensité de coloration la plus faible (28 degrés Meunier pour M/50).

Les génalcaloïdes atropiniques donnent, dans le cas de la génatropine et de la génohyoscyamine, des intensités colorées nettement supérieures à celles données par les alcaloïdes correspondants. La génoscopolamine, par contre, se comporte sensiblement comme la scopolamine.

Si on compare l'intensité de la réaction colorée pour la concentration 0,01 M d'alcaloïdes, on peut établir les valeurs suivantes en donnant la valeur de référence 1 à l'atropine.

Atropine.	1	Apoatropine.	4
Hyoscyamine.	1	Génohyoscyamine. . .	1,7
Homatropine.	0,7	Génatropine.	1,7
Scopolamine.	2,5	Génoscopolamine . . .	2,5

On constate que les génalcaloïdes atropiniques donnent une réaction nettement plus intense que les alcaloïdes correspondants. Il est probable que cela tient à leur hydrolyse plus rapide. C'est pourquoi nous avons fait agir, sur une solution d'atropine et d'hyoscyamine 0,01 M, l'hydroxylamine alcaline pendant des temps al-

lant de deux à trente minutes ; la coloration alors obtenue pour la solution d'atropine est aussi intense que pour celle du génalcaloïde, ce que montre bien que la différence précédemment notée est due aux vitesses d'hydrolyse différentes.

3° *Alcaloïdes du groupe de la yohimbine et de la réserpine.*

Etude spéciale de quelques alcaloïdes [1] *de* Rauwolfia Serpentina.

La réaction, indiquée comme nulle dans le cas des alcaloïdes-esters du groupe de la yohimbine, est pourtant modérément positive après contact prolongé, et même plus intensément encore si la réaction est faite en milieu alcoolique dans le cas de l'yohimbine, alors qu'elle reste négative pour la corynanthine.

Dans nos conditions expérimentales, la réserpine donne une réaction pratiquement nulle. Il n'en faut pas pour autant conclure que la réaction à l'hydroxylamine ne peut s'appliquer au cas de la réserpine. Cet alcaloïde-ester peut en effet s'hydrolyser en acide triméthoxybenzoïque, méthanol et acide réserpinique.

Toutefois, cette hydrolyse ne se fait qu'avec lenteur, du moins en comparaison avec d'autres alcaloïdes-esters comme : la cocaïne, l'héroïne ou l'aconitine. Aussi la réaction devient-elle positive si l'on prolonge pendant trente minutes à froid le contact avec la solution alcaline d'hydroxylamine ; la réaction est encore plus intense si l'on opère en milieu alcoolique, car dans ces conditions l'alcaloïde ne précipite pas lorsqu'on passe en milieu alcalin ; ainsi, la réaction d'hydrolyse et la formation du dérivé hydroxamique est facilitée. Ceci se produit aussi dans le cas de la rescinnamine, autre alcaloïde du *Rauwolfia*, qui ne diffère de la réserpine

(1) Produits obligeamment fournis par les Laboratoires SERVIER.

que par l'estérification de l'acide triméthoxycinnamique au lieu de l'acide triméthoxybenzoïque.

L'alcaloïde est dissous dans l'alcool à 95 degrés avec une petite quantité de solution d'acide tartrique à 10 % dans l'eau. A 1 cm^3 de solution alcoolique tartrique de réserpine ou de rescinnamine, on ajoute 0,4 cm^3 de solution alcaline d'hydroxylamine, on laisse en contact à la température du laboratoire pendant trente minutes. On ajoute ensuite : HCl 4 M = 0,3 cm^3, puis Fe Cl_3 0,37 M = 0,2 cm^3, seulement 2 cm^3 d'eau pour éviter l'apparition de trouble.

Dans ces conditions, une coloration rose violacé apparaît.

La solution reste parfaitement limpide et la coloration, qui va en augmentant pendant quelques minutes, puis reste stable, est proportionnelle à la quantité d'alcaloïde de la prise d'essai. Comme toujours, la lecture est faite à l'électrophotomètre, filtre vert 520 mμ, cuve de 1 cm.

Nos essais ont porté sur des concentrations allant de 0,2 à 2 mg par centimètre cube. Ils donnent dans ces conditions des colorations dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de réserpine ou de rescinnamine, la réserpine donne une coloration rouge violacé, la rescinnamine donne une coloration d'un violet plus franc que celui de la réserpine. L'intensité de la coloration obtenue est indiquée par les courbes du graprique ci-contre.

Nous avons par ailleurs étudié d'autres alcaloïdes issus de *Rauwolfia* (raupine et raubasine), ou des dérivés de la réserpine, qui donnent, dans les conditions ci-dessus indiquées (solution alcolique, contact de trente minutes avec l'hydroxylamine et dilution par 2 cm^3 d'eau), les résultats suivants pour 2 mg par centimètre cube.

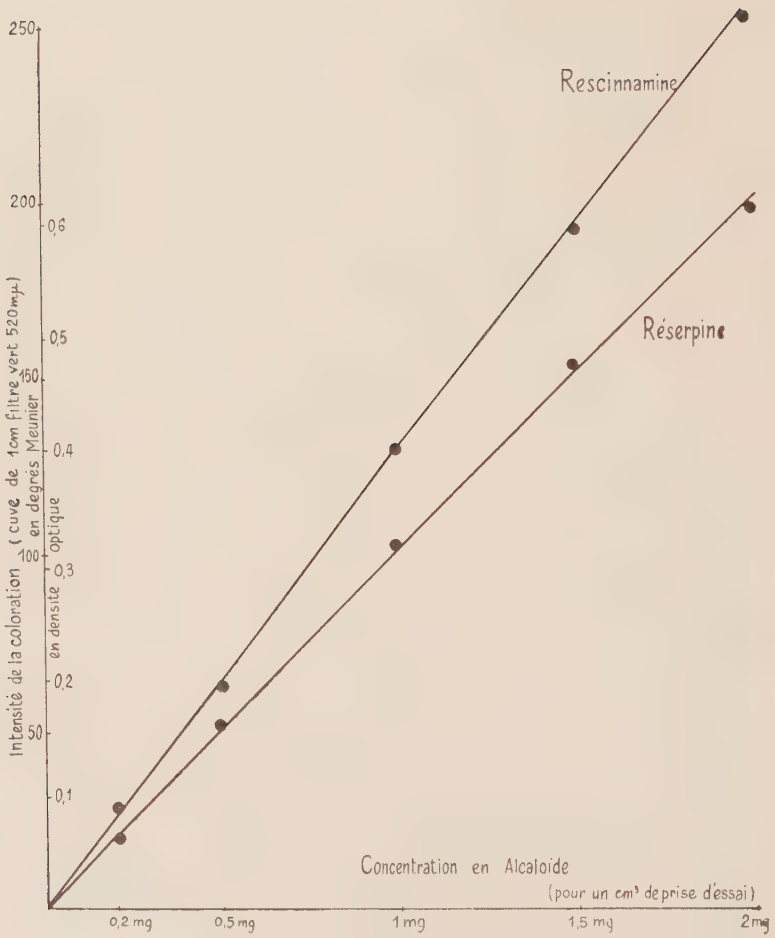


FIG. 3.

TABLEAU II

INTENSITÉ DE LA COLORATION POUR UNE PRISE D'ESSAI DE 2 MG.

ALCALOÏDES ÉTUDIÉS	degrés Meunier	D.O.
10 méthoxydéserpidine	215	0,77
3, 4, 5 triméthoxycinnamoylréserpate d'éthyle	340	1,05
Raupine	80	0,24
Raubasine	0	0

La 10 méthoxydéserpine, isomère de la réserpine, donne pratiquement les mêmes résultats. Le 3, 4, 5 triméthoxycinnamoylréserpate d'éthyle donne une coloration encore plus intense ; enfin, la raubasine, non pourvue de fonction ester, ne donne pas de coloration. Par la réaction à l'hydroxylamine, on peut donc très facilement doser ces différents alcaloïdes-esters de *Rauwolfia* pour le contrôle du titre de leurs solutions et de leurs conservations, en opérant simultanément sur l'échantillon à doser et sur des étalons d'alcaloïdes purs.

Pour le dosage de chacun de ces alcaloïdes dans la drogue ou le bloc des alcaloïdes totaux, le problème est beaucoup plus compliqué. Il apparaît en effet impossible de différencier la réserpine de la rescinnamine par cette seule technique, mais une mise au point délicate de cette méthode pourrait cependant donner des résultats intéressants. On peut, semble-t-il, au moins espérer que par mesure de l'intensité de la réaction sur le bloc des alcaloïdes totaux, on pourra se rendre compte de la teneur relative en alcaloïdes-esters du type réserpine, sans doser pour cela ce seul alcaloïde.

II. — ALCALOIDES NON POURVUS DE FONCTION ESTER.

La réaction à l'hydroxylamine chlorure ferrique étant essentiellement une réaction des esters, il était logique de s'attendre à la trouver négative dans le cas des alcaloïdes non pourvus d'une telle fonction. Toutefois, nous avons jugé utile d'en faire l'étude systématique afin de connaître quels alcaloïdes pourraient donner une coloration dans ces mêmes conditions, notamment par le chlorure ferrique (phénols).

Effectivement, aucune coloration n'a été observée dans nos conditions expérimentales pour les alcaloïdes suivants : arécaïdine, aspidospermine (cette dernière est

pourvue d'un groupe N acétyle est en effet un amide et non un ester), brucine, caféine, codéine, cicutine, dionine, émétine, éphédrine, ergotamine, ergotinine, ibogaïne, lobéline, nicotine, papavérine, pellétiérine, pipérine (amide et non ester), pseudojervine, quinine, quinidine, spartéine, strychnine, thébaïne, tubocurarine. La morphine, pourvue d'une fonction phénol, ne donne dans nos conditions expérimentales avec l'hydroxylamine alcaline, puis HCl, puis $FeCl_3$, qu'une coloration tout à fait négligeable, même pour 5 mg, alors qu'elle donne une coloration bleue très nette par traitement à Na OH seule, puis $FeCl_3$ après acidification par HCl, l'hordénine, phénol elle aussi, ne donne qu'une teinte très minime.

Signalons que la colchicine provoque une coloration jaune par la soude, aussi bien avec que sans hydroxylamine, coloration qui devient brune par addition de $FeCl_3$ en milieu acide, dans le cas où on a utilisé l'hydroxylamine (aspect limpide en milieu alcoolique 50 degrés et trouble en milieu aqueux), et verte dans l'essai sans hydroxylamine.

L'apomorphine permet d'observer une coloration jaune faible par addition de solution alcaline d'hydroxylamine, qui devient rouge intense lrosqu'on revient en milieu acide par HCl et brun rouge après l'addition de $FeCl_3$, l'essai par la soude sans hydroxylamine donne une teinte brun rouge qui devient vert brun par HCl et brun rouge intense par $FeCl_3$. Un trouble se produit lorsqu'on dilue avec l'eau, mais le liquide reste limpide lorsqu'on dilue à l'alcool. Dans le cas de l'apomorphine, la coloration est plus intense quand la réaction a été faite en présence d'hydroxylamine, mais il semble que les deux OH phénoliques de l'apomorphine soient responsables en grande partie de cette coloration.

Beaucoup plus intéressant est le cas de la pilocarpine. En effet, Hestrin [17], dans son étude sur la réaction hydroxamique appliquée aux esters, avait in-

diqué que cette réaction pouvait donner d'excellents résultats avec d'autres substances et en particulier avec celles possédant une fonction lactone facilement labile. C'est pourquoi nous avons recherché si la pilocarpine, alcaloïde principal de Jaborandi, qui ne possède pas de fonction ester, mais dont la molécule comporte un anneau lactonique s'ouvrant facilement par hydrolyse en donnant l'acide pilocarpinique, était capable de donner la réaction colorée hydroxamique et si, par suite, là encore, on pouvait trouver un champ d'application nouveau à cette réaction en pharmacie.

Etude spéciale de la pilocarpine.

Technique.

Sur une solution de nitrate de pilocarpine à 10 mg par centimètre cube dans l'eau distillée, nous avons opéré des dilutions pour obtenir des concentrations allant de 10 mg à 1 mg par centimètre cube. On ajoute alors les réactifs cités déjà plus haut, l'attente après l'addition de la solution alcaline d'hydroxylamine est d'environ deux minutes et la dilution finale se fait avec 5 cm^3 d'eau.

Résultats.

On constate que la réaction est très positive et que la pilocarpine donne après action de l'hydroxylamine en milieu alcalin, puis acidification et addition de perchlorure de fer, une coloration rouge intense.

Il apparaît donc que la pilocarpine, dans les conditions où l'on opère, laisse facilement ouvrir son cycle lactonique pour donner un dérivé hydroxamique de l'acide pilocarpinique.

Nous voyons que pour une prise d'essai de l'ordre du milligramme, nous obtenons alors une coloration déjà intense, correspondant à 75 degrés Meunier. La courbe obtenue est pratiquement une droite pour les

prises d'essai de 0 à 5 mg, puis elle devient asymptoïque pour des concentrations supérieures.

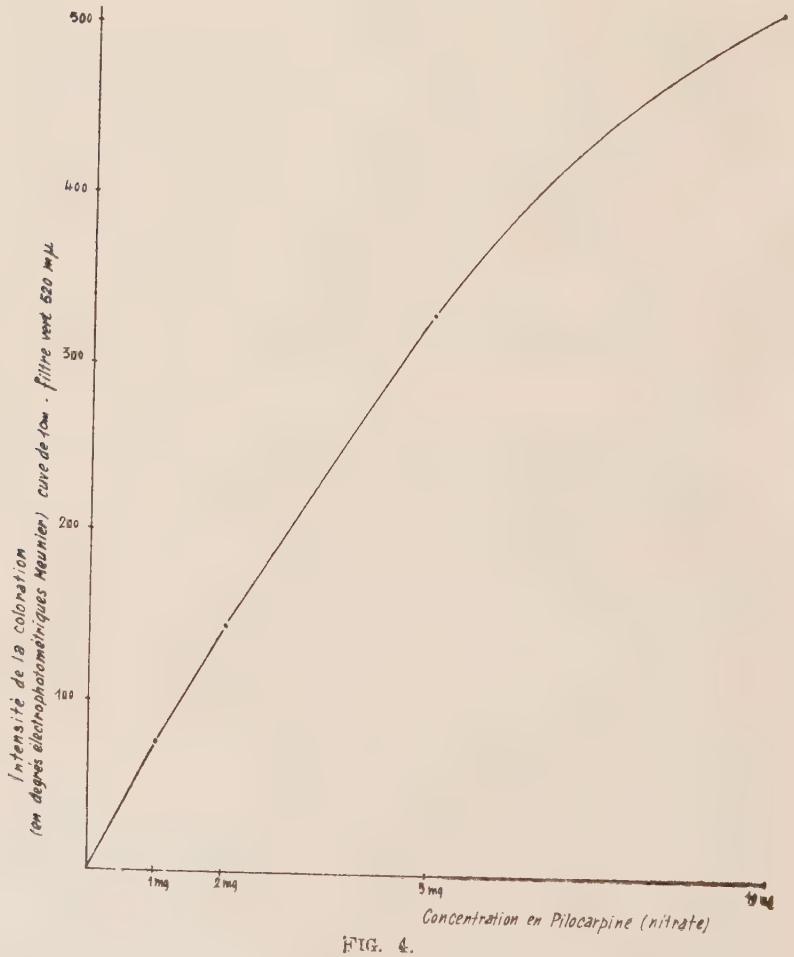


FIG. 4.

Cette réaction colorée, qui comporte une excellente stabilité, constitue donc une méthode de dosage intéressante du nitrate de pilocarpine en solution pure par sa facilité et sa rapidité d'exécution. Cependant, il nous a paru intéressant de pousser cette étude en appliquant cette réaction à une préparation galénique, la teinture

de Jaborandi. Voici la technique suivie pour cet essai : à 1 cm^3 de teinture de Jaborandi, on ajoute 0,4 de réactif à l'hydroxylamine alcaline, puis 0,3 cm^3 d'HCl 4 M, puis 0,2 cm^3 de solution de chlorure ferrique et enfin on dilue par 5 cm^3 d'alcool à 60 degrés. Nous employons ici de l'alcool à 60 degrés pour éliminer toute turbidité pouvant gêner la lecture à l'électrophotomètre.

Comme la teinte est beaucoup moins pure que dans les essais effectués sur la pilocarpine pure, à cause de la coloration propre des pigments de la teinture officinale, nous avons essayé d'éliminer cet inconvénient en utilisant comme témoin la teinture elle-même, 1 cm^3, additionnée de NaOH sans hydroxylamine, puis acidifiée par HCl, et additionnée de la solution ferrique et diluée par l'alcool dans les mêmes conditions que précédemment.

Nous obtenons alors par différence, après mesure électrophotométrique, une coloration rouge pour l'essai, de l'ordre de 130 degrés Meunier. Malgré la coloration de la teinture l'emploi du filtre vert 520 $m\mu$ permet de titrer sélectivement la composante rouge de la teinte globale.

Nous avons aussi tenté d'éliminer au maximum la coloration propre de la teinture, et pour cela nous avons procédé à deux essais en décolorant la teinture par deux absorbants :

— le talc, qui décolore peu,

— le charbon animal, qui donne un filtrat incolore.

La réaction, effectuée sur 1 cm^3 de filtrat incolore, donne une teinte rouge très pure de l'ordre de 125 degrés Meunier, tout à fait comparable à celle des étalons de solution pure.

Par ailleurs, à titre de vérification, nous avons effectué sur 10 cm^3 de teinture une extraction des alcaloïdes, le résidu d'évaporation obtenu a été repris par 10 cm^3 d'eau distillée, et nous avons effectué la réac-

tion hydroxamique sur 1 cm^3 de cette solution. Nous avons alors obtenu une coloration rouge dont l'intensité était évaluée à 110 degrés Meunier.

Si l'on se rapporte à la courbe étalon obtenue pour les différentes concentrations de nitrate de pilocarpine en solution pure, nous obtenons les résultats numériques ci-dessous pour des prises d'essais de 1 cm^3 de teinture.

TABLEAU III

	(A)	(B)	(C)
	—	—	—
Teinture de Jaborandi utilisée telle quelle.	130°	1,75 mg	0,87 %
Teinture de Jaborandi décolorée par le charbon animal.	126°	1,70 mg	0,85 %
Alcaloïdes extraits à partir de la teinture pour 1 cm^3.	110°	1,50 mg	0,75 %

(A) *Intensité de la coloration (en degrés Meunier).*
(B) *Poids d'alcaloïdes (en pilocarpine).*
(C) *Pourcentage d'alcaloïdes (en pilocarpine) calculé d'après le poids de plante sèche.*

Des études plus approfondies permettront de préciser les possibilités de dosage de la pilocarpine dans les milieux complexes, mais les résultats obtenus ici, dans cette étude sommaire, permettent de penser que la réaction à l'hydroxylamine peut être aussi la base non seulement du dosage de la pilocarpine en solution pure, mais encore d'applications utiles et pratiques dans le dosage de cet alcaloïde dans les préparations galéniques.

Applications pratiques.

A la suite de ces constatations, nous pouvons très succinctement définir quelqes cas où la réaction à l'hydroxylamine Fe Cl$_3$ peut être particulièrement utile dans l'étude des alcaloïdes en pharmacie. D'abord, elle peut

servir à l'identification de quelques alcaloïdes donnant très intensément cette réaction, par exemple pour distinguer l'héroïne de la morphine, la pseudoaconitine de l'aconitine, la cocaïne de l'ecgonine, l'apoatropine de l'atropine, etc.

Ensuite, elle permet avec beaucoup de précision en se servant d'étalons traités de façon identique et en même temps, le dosage de certains alcaloïdes, selon une technique particulièrement simple et rapide. La cocaïne, l'aconitine, l'héroïne, l'arécoline, la pilocarpine, la cassaïne, les protovératrines et même la réserpine, à condition, pour cette dernière, utilisée en solution alcoolique acidifiée par une solution d'acide tartrique, de prolonger le temps de contact avec l'hydroxylamine alcaline, peuvent être dosées de cette façon sur des prises d'essais de l'ordre du milligramme, et l'ésérine et la génésérine sur des quantités encore plus faibles. Le cas des alcaloïdes atropiniques, par contre, est moins favorable étant donné la faible intensité de la coloration qu'ils provoquent, mais la réaction peut être utilisée, soit sur de plus fortes prises d'essais de l'ordre de 10 mg, soit simplement en prolongeant le temps de contact avec l'hydroxylamine alcaline. Ainsi cette réaction peut elle aussi servir au contrôle des solutions de ces divers alcaloïdes, leur hydrolyse spontanée se traduisant par une diminution de la réaction colorée, qu'il est facile de déterminer.

Enfin, on peut espérer pouvoir appliquer aussi cette réaction colorée au dosage de certains alcaloïdes dans les préparations galéniques (extraits et teintures) et bloc des alcaloïdes totaux ; mais ici des mises au point particulières sont nécessaires et sortent du cadre général de cette étude.

Chapitre III

HÉTÉROSIDES CARDIOTONIQUES.

Le problème de l'identification et du dosage des hétérosides digitaliques présente de nombreuses difficultés, dues bien souvent à la complexité des méthodes employées. Il nous a donc paru digne d'intérêt de rechercher si la réaction à l'hydroxylamine chlorure ferrique pouvait être utilisée dans le cas de ces hétérosides cardiotoniques. Certains, portant un radical acétyle, semblaient en effet pouvoir être identifiés et même dosés par cette réaction.

Il faut noter que Frèrejacques [16], ainsi que Abdel-Aker et F. Smith [1] ont préconisé l'usage de cette réaction pour la diagnose des hétérosides digitaliques à radical acétyle, après dépôt des solutions sur papier. Or, il ne semble pas que la technique indiquée par Frèrejacques [16] (qui utilise la pulvérisation de l'hydroxylamine, puis du perchlorure de fer pour l'identification sur papier de taches obtenues par chromatographie, en déposant des solutions de ces hétérosides) puisse rendre des résultats autres que qualitatifs. Notre méthode peut se prêter à l'identification de ces hétérosides dans l'essai des médicaments, et surtout à leur dosage éventuel dans les solutions pharmaceutiques. Nous

rapportons ici les résultats obtenus concernant la plupart des hétérosides cardiotoniques usuels acétylés ou non [1].

— Nous opérons ici sur des solutions alcooliques, afin de solubiliser les hétérosides étudiés, et la dilution finale est faite en milieu alcoolique pour éviter toute turbidité.

Le temps d'action de l'hydroxylamine alcaline est d'environ deux minutes, avant l'acidification et l'addition de Fe Cl_3.

Résultats.

Nous apportons ci-dessous le résultat obtenu dans les conditions indiquées plus haut par la mesure de la coloration que donne une prise d'essai de 5 mg pour chaque hétéroside (filtre vert 520 mμ, cuve de 1 cm).

TABLEAU IV

INTENSITÉ DE LA COLORATION POUR UNE PRISE D'ESSAI DE 5 MG.

HÉTÉROSIDES ÉTUDIÉS	degrés Meunier	densité optique
—	—	—
Lanatoside A (digilanide A)	185	0,57
— B (— B)	245	0,76
— C (— C)	205	0,63
Acétyldigitoxoside (acétyldigitoxine)	180	0,56
Digitoxoside (digitaline)	42	0,13
Gitoxoside (gitoxine)	46	0,14
Digoxoside (digoxine)	14	0,04
Ouabaïne (G strophantoside)	20	0,06
Cymaroside (cymarine) (k strophantoside)	22	0,07
Oléandroside (oléandrine)	340	1,05
Scillarène	100	0,31
Scillirosidine	500	1,55
Convallatoxoside (convallatoxine)	20	0,06
Adonidosine	70	0,21
Adonivernoside	85	0,26
Thévêtoside (thévêtine)	38	0,12
Thanginoside (thanginine)	130	0,48
Helléboréine	90	0,28

(1) Les hétérosides purs nous ont été obligeamment fournis par les Laboratoires SANDOZ (lanatosides A, B, C acétyl digitoxo-

Commentaires.

Ces résultats montrent que les hétérosides comportant un groupe acétyle dans leur molécule (lanatosides, acétyldigitoxosides, oléandroside, scilliroside, tanghinoside), donnent une coloration intense correspondant à la formation d'acide acétyl hydroxamique, puis de son complexe ferrique rouge. Toutefois, même les hétérosides ne possédant pas de groupement acétylé peuvent donner dans les mêmes conditions une coloration appréciable, bien que plus faible. Ceci peut être expliqué par la rupture du cycle lactonique et la formation d'un dérivé hydroxamique correspondant à l'acide formé. En effet, HESTRIN [17] a signalé que des lactones peuvent donner la réaction, sans d'ailleurs citer les hétérosides cardiotoniques. Ces dérivés sont cependant, toujours dans nos conditions expérimentales, beaucoup moins colorés que ceux provenant des dérivés acétylés. Il y a lieu toutefois de remarquer que, parmi les hétérosides non acétylés, le scillarène, l'helléboréine et les hétérosides de l'Adonis se distinguent par une coloration relativement intense, témoin sans doute d'une solidité moins grande de leur anneau lactonique.

Dans l'ensemble, nos résultats quantitatifs confirment les données qualitatives apportées par FRÈREJACQUES [16]. Celui-ci indique que la révélation sur papier des taches de solutions d'hétérosides est positive pour le digilanide C, l'oléandrine, la tanghinine, ainsi que la prototanghinine et la vénéniférine, que nous n'avons pas nous-même étudiées faute d'avoir pu nous les procurer. Il signale par contre que les dérivés acétylés en 3 de

---

side, scillarène, scillirosidine), NATIVELLE (digitoxoside, gitoxoside, digoxoside, ouabaïne, cymaroside et oléandroside), HOUDÉ (adonidoside et adonivernoside), DEBAT (convallatoxoside), DELALANDE (thévétoside). Nous exprimons notre gratitude à MM. les Directeurs de ces Laboratoires, ainsi qu'à M. le docteur Raymond HAMET, qui nous a permis d'utiliser le tanghinoside de sa collection personnelle.

la digitoxigénine et de la strophantidine ne donnent pas la réaction, admettant que les acétyles fixés en 3 (et aussi en 12) sont plus difficiles à scinder que ceux fixés en 7 et en 16.

Nos résultats montrent que l'acétyle de l'oléandroside fixé en 16 et celui du scilliroside fixé sur l'anneau lactonique se laissent facilement détacher.

Il semble que les différences d'intensité de coloration notées parviennent d'une aptitude plus ou moins grande de ces composés à libérer complètement leur acétyle sous l'influence de l'hydroxylamine alcaline.

Applications pratiques

Ces diverses données analytiques peuvent être l'objet d'applications pratiques portant sur l'identification de ces divers hétérosides et, dans certains cas, sur leur dosage dans les préparations pharmaceutiques.

1) *Application à l'identification des hétérosides cardiotoniques.*

La mise en œuvre de la technique ci-dessus décrite permettra facilement de déterminer s'il s'agit d'un hétéroside acétylé ou non, tellement est intense la coloration obtenue dans le premier cas. La comparaison précise avec le résultat obtenu en utilisant un étalon de produit pur sera nécessaire pour identifier avec plus de certitude l'hétéroside auquel on a à faire. Bien entendu, les chiffres donnés plus haut ne correspondent qu'à des conditions expérimentales précises et déjà citées précédemment, car certains essais nous ont révélé que la coloration pouvait être bien plus intense si l'on laissait agir l'hydroxylamine alcaline pendant un temps plus long. De plus, une telle méthode n'a de valeur que lorsqu'il est préalablement établi qu'il s'agit d'un hétéroside, car de nombreuses substances d'autres groupes

(esters) peuvent donner la réaction hydroxamique, tandis que d'autres (phénols) réagissent directement avec Fe Cl3.

2) *Applications au dosage.*

L'application au dosage des hétérosides acétylés en solution pure ne soulève aucune difficulté. Il suffit de pratiquer la réaction sur une solution étalon de l'hétéroside à doser, aux diverses concentrations, et de répartir sur la droite obtenue les résultats donnés par la solution étudiée.

L'exemple ci-dessous, concernant le lanatoside B, l'oléandrine et l'acétyl digitoxoside, montre bien que l'intensité de la coloration suit, du moins pour une assez large zone de concentration, la loi de Beer-Lambert et se traduit par une droite (fig. 5).

Plus délicate est la question du dosage de ces hétérosides en solution contenant divers autres produits ou excipients. Là, il s'agit de cas d'espèce, dont chacun doit faire l'objet d'une étude spéciale. qui sort du cadre de ce travail. A titre d'exemple, afin de montrer les difficultés auxquelles on peut se heurter, indiquons que les solutions officinales contenant du glycérol, comme c'est le cas de la solution officinale de digitaline à 1 ‰, donnent une intense coloration. La constatation de ce fait, à première vue surprenant, étant donné que la digitaline (digitoxoside) ne donne à l'état pur qu'une coloration très faible, nous a incité à incriminer le glycérol entrant dans la formule de la solution officinale. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de procéder à des essais sur différents échantillons de glycérine [51]. et effectivement la réaction a été positive, prouvant ainsi que le glycérol renferme encore des quantités notables d'esters susceptibles de réagir avec l'hydroxylamine. Nous en ferons l'étude plus complète dans le chapitre se rapportant aux esters d'acides gras.

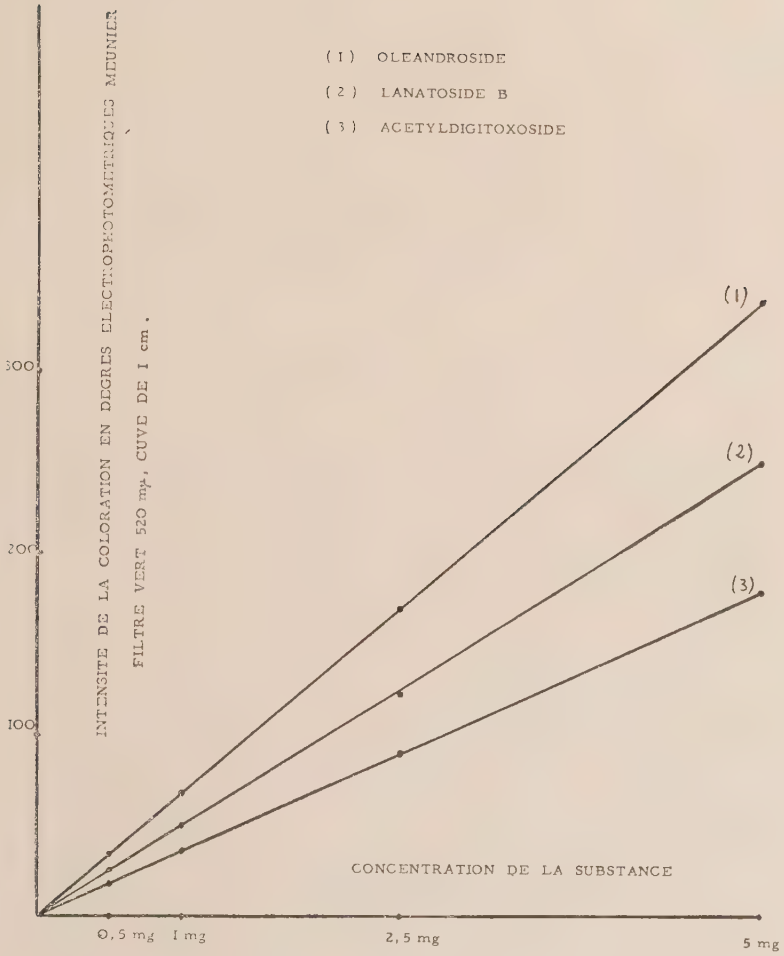

(1) OLEANDROSIDE
(2) LANATOSIDE B
(3) ACETYLDIGITOXOSIDE
INTENSITE DE LA COLORATION EN DEGRES ELECTROPHOTOMETRIQUES MEUNIER
FILTRE VERT 520 mμ, CUVE DE 1 cm.
300
200
100
(1)
(2)
(3)
CONCENTRATION DE LA SUBSTANCE
0,5 mg
1 mg
2,5 mg
5 mg

FIG. 5.

Chapitre IV

ANTIBIOTIQUES

(pénicillines et dérivés, érythromycine [esters] et oléandomycine [esters]).

Dans les chapitres précédents, nous avons vu l'immense intérêt présenté par la réaction à l'hydroxylamine, en ce qui concerne l'étude analytique et le dosage des esters. Mais, en outre, cette réaction peut être utilisée pour des substances ne comportant pas de fonction ester. Hestrin [17], signalant qu'elle pouvait être provoquée par d'autres substances, indiquait à ce propos que la pénicilline, par son groupe lactame, donnait une réaction positive. Peu nombreux ont été ces essais effectués dans le cas particulier de la pénicilline. Signalons les travaux de L. Mazor [35] sur le dosage de la pénicilline sous forme de complexe de fer III hydroxamate, de Morch, Thompson [46], de Ford [13].

Il nous a donc paru intéressant de pratiquer quelques essais d'application de la réaction hydroxylamine chlorure ferrique à la pénicilline, médicament d'une extrême importance et soumis à d'innombrables investigations analytiques. Les premiers résultats obtenus indiquent que cette technique représente une excellente méthode pratique de dosage de la pénicilline.

Par ailleurs, nous avons procédé à plusieurs essais sur la bipénicilline, la pénicilline V, le pénicillinate de

procaïne et des antibiotiques de groupes différents, la propiocine et son laurylsulfate, l'érythromycine base et son éthylsuccinate, ainsi que l'oléandomycine et son ester acétylé.

I. — Pénicilline G.

1° *Données techniques.*

Nous traiterons en premier lieu de la pénicilline G, communément employée en thérapeutique. Nous avons utilisé pour nos essais des pénicillines G de diverses origines [1].

La réaction est faite sur une prise d'essai de 10 mg dans 1 cm^3 d'eau distillée ; nous avons opéré sur des dilutions donnant des prises d'essai de 10 mg à 1 mg par centimètre cube. A 1 cm^3 de solution, on ajoute les réactifs habituels de la réaction à l'hydroxylamine perchlorure de fer, en spécifiant toutefois que, dans les conditions expérimentales, le temps d'action laissé à l'hydroxylamine alcaline est d'environ deux minutes, et que la dilution finale est faite avec 5 cm^3 d'eau distillée.

La lecture est faite à l'électrophotomètre de Jobin-Yvon ou Meunier, cuve de 1 cm, filtre vert 520 mμ. Les résultats sont exprimés en D.O. ou en degrés Meunier.

Signalons que 10 mg de pénicilline correspondent à 16 666 unités OX.

2° *Résultats.*

On constate que la réaction est très positive et que la pénicilline (10 mg) donne, après action de l'hydroxylamine, puis acidification et addition de $Fe\,Cl_3$,

(1) Nous remercions MM. les Directeurs des Laboratoires Specia, Roussel-Uclaf et Roger Bellon, qui ont aimablement mis à notre disposition les produits nécessaires à cette étude.

une coloration rouge intense (de l'ordre de 250 degrés Meunier, soit une D.O. de 0,78).

Pour les concentrations inférieures, l'intensité de coloration reste proportionnelle à la concentration. (Fig. 6.)

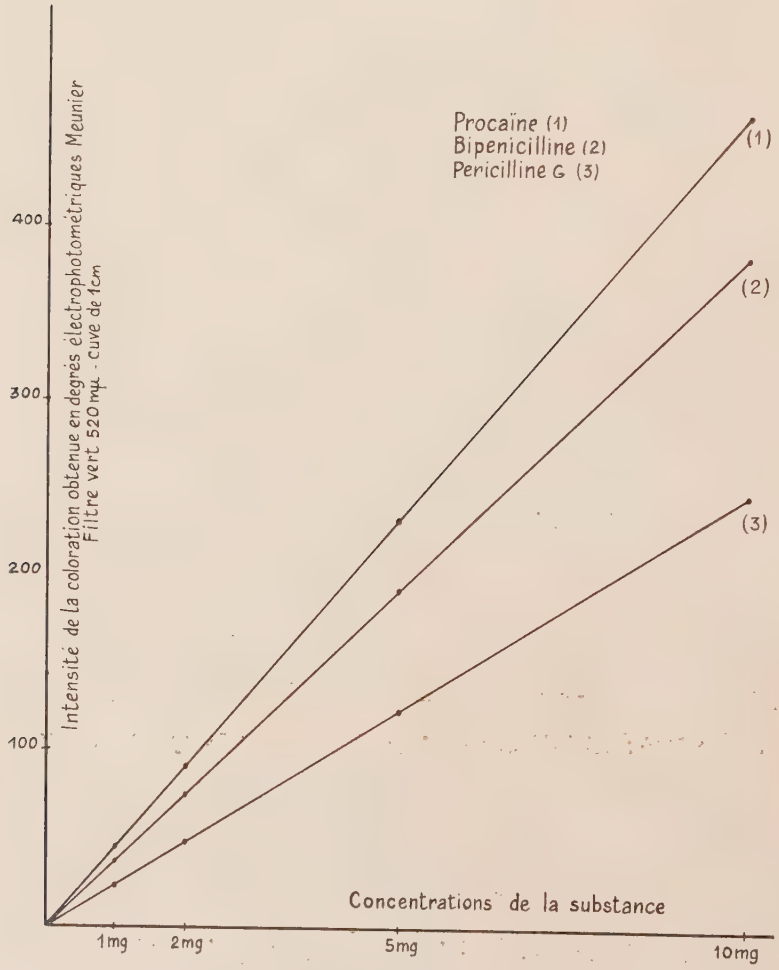
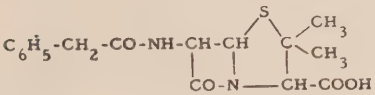


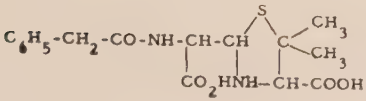
FIG. 6.

3° *Commentaires.*

Ainsi, nous confirmons que la pénicilline G donne une réaction positive intense. Il semble donc bien que l'hydrolyse alcaline provoque l'ouverture du noyau lactame de la pénicilline.



PENICILLINE G



ACIDE PENICILLOIQUE

Il est probable que l'hydroxylamine donne un hydroxamate de l'acide pénicilloïque formé. En milieu acide et en présence d'une solution de chlorure ferrique, cet acide donne un complexe ferrique de coloration rouge, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration d'hydroxamate, donc de pénicilline, dans le milieu avant la réaction. La coloration obtenue est stable et permet d'excellentes mesures colorimétriques. La méthode est ainsi parfaitement applicable au dosage de la pénicilline G en solution pure.

II. — Autres pénicillines.

Nous avons essayé d'appliquer cette méthode à d'autres formes commerciales de la pénicilline ou de ses sels, tels que : la bipénicilline, le pénicillinate de procaïne, la pénicilline V ou pénicilline acide, la phényracilline (alfadryl).

Nous résumons dans le tableau ci-dessous les résultats obtenus par la réaction hydroxamique perchlorure de fer, en rappelant que le temps de contact de

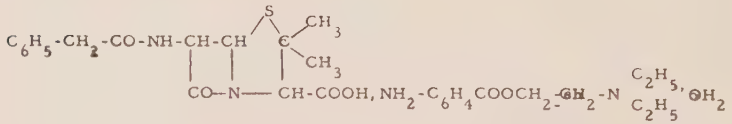
l'hydroxylamine alcaline est d'environ deux minutes, que la dilution terminale est faite avec 5 cm^3 d'eau distillée.

TABLEAU V

INTENSITÉ DE LA COLORATION POUR UNE PRISE D'ESSAI DE 10 MG.

	D.O.	degrés Meunier
	—	—
Pénicilline. . .	0,78	245
Bipénicilline. . .	1,25	390
Pénicillinate de procaïne. . .	1,14	365
Pénicilline V. . .	1,45	466
Phényracilline (alfadryl) . . .	0	0

La bipénicilline et le pénicillinate de procaïne attirent particulièrement notre attention, car ces deux corps possèdent dans leur molécule celle de la procaïne. Or, cette dernière possède dans sa structure une fonction ester, comme nous pouvons le voir dans la formule ci-contre :



PENICILLATE DE PROCAINE

Cette fonction ester est susceptible de donner la réaction hydroxamique et, par conséquent, une coloration avec le perchlorure de fer, coloration qui viendra s'ajouter à celle obtenue par la pénicilline.

C'est pourquoi nous avons jugé nécessaire d'effectuer une détermination sur une solution de procaïne. La réaction est faite dans les conditions habituelles de l'expérience, et sur des concentrations allant de 10 mg à 1 mg par centimètre cube de solution.

1 mg/cm^3	2 mg/cm^3	5 mg/cm^3	10 mg/cm^3
53	106	240	466

(en degrés Meunier).

Nous voyons que pour 10 mg la coloration est extrêmement forte et que, pour 1 mg, elle est encore importante. Il est donc certain que, dans le dosage de la bipénicilline du commerce, la coloration due à la présence de la molécule de procaïne vient s'ajouter à celle de la pénicilline.

III. — Autres antibiotiques.

Nous avons étendu nos recherches à d'autres antibiotiques et particulièrement au groupe de l'érythromycine et de l'oléandomycine.

La réaction hydroxamique est toujours faite dans les conditions habituelles, sur des prises d'essai de solutions alcooliques à 10 ‰. Nous avons procédé comme pour la pénicilline en laissant agir la solution d'hydroxylamine alcaline pendant environ deux minutes, la dilution finale étant faite avec 5 cm^3 d'eau distillée.

Résultats.

1° *Erythromycine et ses dérivés.*

Le tableau ci-dessous groupe les résultats obtenus pour ces antibiotiques :

TABLEAU VI

Intensité de la coloration pour une prise d'essai de 10 mg.

	D.O.	degrés Meunier
	—	—
Erythromycine base	0,08	26
Erythromycine éthylsuccinate	1,21	390
Propiocine (propionate d'érythromycine)	0,23	77
Propiocine laurylsulfate	0,09	29

Seul, l'ester éthylsuccinique de l'érythromycine donne une intense coloration, et il apparaît bien que la coloration obtenue vient de la rupture de la fonction ester éthylsuccinique.

Les autres corps ne donnent que de faibles colorations pour une prise d'essai de 10 mg.

Il est curieux de constater que la fonction ester propionique ne donne qu'une faible coloration. On pouvait supposer que l'hydrolyse se fait plus lentement et qu'il est nécessaire de laisser l'hydroxylamine alcaline en contact pendant au moins trente minutes, il n'en est rien, car même après ce temps de contact la coloration obtenue reste identique à la précédente.

Le dérivé laurylsulfate de propiocine, qui n'est pas un ester, donne des chiffres encore plus faibles ; peut-être est-il ici encore nécessaire de laisser en contact avec l'hydroxylamine alcaline un temps de trente minutes ? Mais nous pensons que la présence du laurylsulfate empêche la bonne marche de la réaction, car HESTRIN [17] avait déjà noté que certains ions (phosphates, fluorures, oxalates, sulfates), se combinant avec le fer, ont un effet nettement inhibiteur sur la réaction.

2° *Autres antibiotiques.*

Nous avons enfin procédé à quelques essais sur un autre groupe d'antibiotiques [1] comprenant :

— oléandomycine et triacétyl oléandomycine,
— viomycine,
— tétracycline (tétracyne),
— oxytétracycline (terramycine),
— polymixine.

Seule, la triacétyl oléandomycine a donné un résultat positif.

TABLEAU VII

INTENSITÉ DE LA COLORATION POUR UNE PRISE D'ESSAI DE 1 MG.
(après trente minutes d'action de l'hydroxylamine alcaline)

	degrés Meunier
Oléandomycine.	12
Triacétyl oléandomycine.	107

(1) Produits obligeamment fournis par les Laboratoires CLIN-PFIZER.

Les autres antibiotiques ne donnent pas lieu à la formation d'un acide hydroxamique. Cependant, nous obtenons tout de même, avec la terramycine et la tétracycline, une belle coloration brun rougeâtre. Mais cette coloration n'est pas due à la réaction à l'hydroxylamine perchlorure de fer, l'expérience nous ayant montré qu'elle était obtenue par la seule addition à la solution d'antibiotique, d'une solution de chlorure ferrique.

Après cette étude systématique de quelques antibiotiques utilisés couramment dans la thérapeutique moderne, il semble que la réaction à l'hydroxylamine perchlorure de fer permette de doser facilement, non seulement les antibiotiques du groupe de la pénicilline, mais également des antibiotiques d'autres groupes, ou tout au moins leurs dérivés esters (éthylsuccinate d'érythromycine, triacétyl oléandomycine), qui peuvent ainsi être facilement distingués de l'antibiotique originel.

Chapitre V

HORMONES STÉROIDES ET LEURS ESTERS.

Dans le groupe si vaste et si capital des hormones, la réaction à l'hydroxylamine peut aussi être appliquée avec succès. En effet, celles-ci sont utilisées en thérapeutique fréquemment sous forme d'ester.

Nous avons eu à notre disposition pour cette étude :

1° cortisone et acétylcortisone ;
2° désoxycortisone, acétyldésoxycortisone ;
3° hémisuccinyl-hydrocortisone ;
4° oestradiol et benzoyloestradiol ;
5° prégnénolone et acétylprégnénolone ;
6° testostérone et acétyltestostérone.

Technique.

Pour nos essais expérimentaux, les hormones étudiées ont été mises en solution à 5 ‰ dans l'alcool à 95 degrés. La réaction était faite sur 1 cm^3 de solution (soit 5 mg), on laissait agir l'hydroxylamine alcaline pendant environ deux minutes, et on diluait avec de l'alcool à 70 degrés pour éviter la formation d'un trouble préjudiciable à la lecture colorimétrique [1].

(1) Nous remercions bien sincèrement : M. Pesez, directeur des recherches analytiques des Laboratoires Uclaf-Roussel, à Paris, qui a eu la grande amabilité de nous procurer les échantillons d'hormones pures soumises à notre étude.

Résultats.

Nous donnons ci-dessous les résultats en degrés Meunier et en D.O. obtenus dans les conditions indiquées plus haut pour une prise d'essai de 5 mg par centimètre cube, cuve 1 cm, filtre vert 520 mμ.

TABLEAU VIII

Intensité de la coloration obtenue pour une prise d'essai de 5 mg/cm³.

	D.O.	degrés Meunier
	—	—
Cortisone	0,10	32
Acétylcortisone	1,09	350
Désoxycorticostérone	0,03	11
Acétyldésoxycorticostérone	1,30	420
Hémisuccinyl-hydrocortisone	0,67	280
Oestradiol	0,02	8
Benzoyloestradiol	1,51	490
Testostérone	0,03	10
Acétyltestostérone	0,43	140
Prégnénolone	0,02	8
Acétylprégnénolone	1,30	420

Commentaires

A la lumière des résultats obtenus, il apparaît immédiatement que les hormones estérifiées se distinguent facilement de celles qui ne le sont pas ; en effet, on obtient des colorations extrêmement intenses, allant de 140 pour l'acétyltestostérone, jusqu'à 490 degrés Meunier pour le benzoate d'oestradiol, cette coloration correspond évidemment à la formation d'acides hydroxamiques, puis de leur complexe ferrique rouge.

Dans le cas des acétyldésoxycorticostérone, acétylprégnénolone, acétylcortisone, acétyltestostérone, il semble qu'il se forme bien un acide acétylhydroxamique, cependant que, dans les deux premiers cas, l'intensité de la coloration est la même, 420, dans le troisième et

le quatrième elle est plus faible, surtout pour l'acétyltestostérone : 350 et 140.

On peut donc penser que la situation différente de la fonction ester intervient dans l'hydrolyse alcaline, la rupture étant effectuée à des vitesses différentes, selon les cas.

Applications pratiques.

Les résultats obtenus montrent qu'on peut facilement identifier, différencier et même doser ces quelques hormones estérifiées.

1° *Identification.*

La différence d'intensité de la coloration obtenue pour chaque substance mise en cause, peut permettre facilement l'identification du produit étudié. La comparaison avec le résultat obtenu en utilisant un étalon de produit pur, peut permettre une identification extrêmement précise.

2° *Dosage.*

Le dosage des hormones estérifiées en solution pure dans l'alcool, ne présente aucune difficulté. Il suffit de pratiquer la réaction hydroxamique sur une solution étalon du produit étudié à doser, à différentes concentrations, et de reporter sur la droite ainsi obtenue les résultats donnés par la solution étudiée.

C'est ainsi que nous avons pu tracer les courbes pour les quelques hormones estérifiées que nous avons étudiées (fig. 7).

Ces résultats montrent que l'intensité de la coloration suit la loi de de Beer-Lambert et se traduit par une droite. Etant donné l'intensité de la coloration obtenue, le dosage peut être effectué commodément sur des prises d'essai de 1 mg.

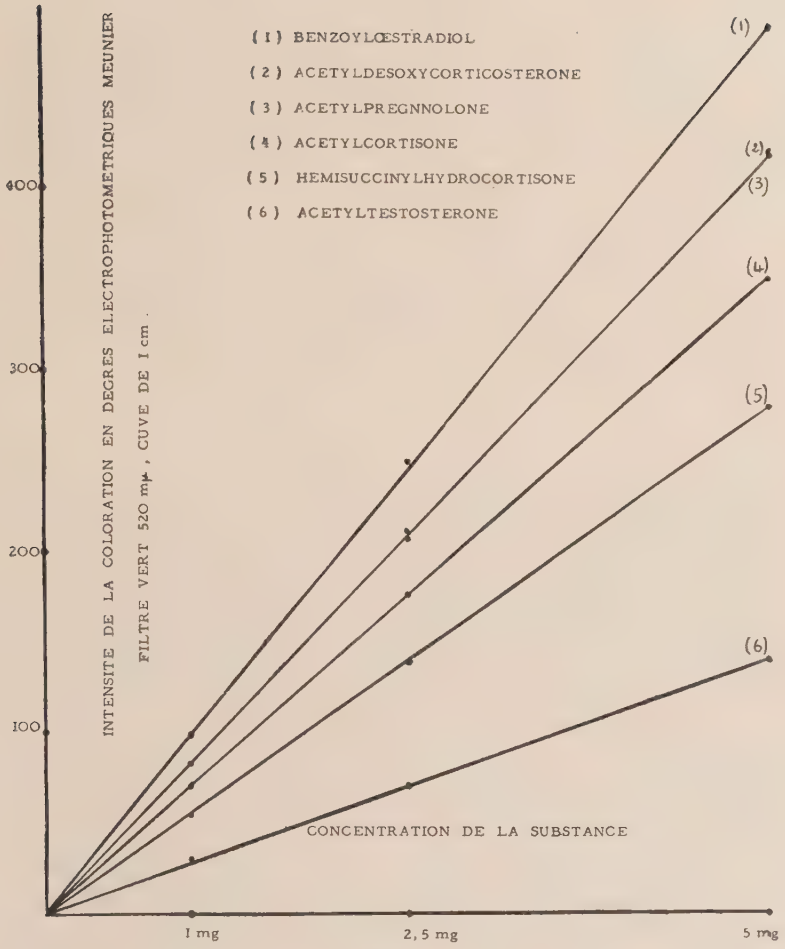


FIG. 7.

CONCLUSION.

La réaction hydroxamique peut donc s'appliquer à l'étude analytique des hormones estérifiées ; on peut classer ces hormones estérifiées en fonction de l'intensité de la réaction, dans l'ordre suivant : benzoyloestradiol, acétyldésoxycorticostérone, acétylcortisone, acétylprégnénolone, acétyltestostérone, hémisuccinyl-hydrocortisone.

Chapitre VI

ESSENCES

Nombreux sont les esters qui entrent dans la composition des essences. Pour certains, même, leur valeur commerciale est établie en fonction de leur richesse en esters. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de rechercher le comportement de diverses essences en regard de la réaction à l'hydroxylamine chlorure ferrique.

Nous nous occuperons tout spécialement de celles qui sont usuellement employées en pharmacie, afin de reconnaître dans quels cas la réaction qui fait l'objet de cette étude, peut éventuellement être appliquée à leur étude analytique.

Dans un premier groupe, nous étudierons les essences de Bergamotte, Cannelle, Romarin, Fenouil, Niaouli, Citron, Orange (Portugal), Menthe, Girofle.

Dans un deuxième groupe, nous nous arrêterons spécialement aux essences de Lavande, Lavandin, d'Aspic, essences caractérisées par leur plus ou moins forte teneur en ester acétique du linalol.

Technique.

L'essence est diluée dans l'alcool absolu, de façon à obtenir des concentrations allant de 10 mg à 1 mg par centimètre cube. La réaction est faite sur 1 cm^3 de solution.

Nous attendons environ une minute après l'addition de l'hydroxylamine alcaline et, après addition de l'acide chlorhydrique et de la solution ferrique, nous diluons avec 5 cm^3 d'alcool à 50 degrés, titre d'alcool grâce auquel la coloration d'intensité maxima paraît être obtenue.

La lecture est effectuée à l'électrophotomètre, cuve de 1 cm, filtre vert de 520 mμ.

Résultats du premier groupe.

Nos essais ont porté sur des échantillons d'essences de : Bergamotte, Cannelle, Romarin, Fenouil, Niaouli, Citron, Orange (Portugal), Menthe, Girofle. Certaines de ces essences renferment des esters à des doses variables. L'intensité de la coloration obtenue, qui varie suivant l'échantillon du jaune au rouge foncé, donne, pour une prise d'essai de 10 mg, les résultats suivants :

TABLEAU IX

Intensité de la coloration pour une prise d'essai de 10 mg.

	degrés Meunier	D.O
	—	—
Essence de Bergamotte.	145	0,45
— Cannelle de Ceylan.	230	0,71
— Romarin.	10	0,03
— Menthe poivrée (deux échantillons de provenance différente)	75 0	0,23 0
— Girofle.	50	0,15
— Citron.	30*	0,09
— Orange (Portugal)	indéterminée	

* (trouble).

A la lecture de ces chiffres, on peut se rendre compte que les essences donnant les meilleurs résultats avec la réaction à l'hydroxylamine $Fe Cl_3$ sont les essences de Bergamotte et de Cannelle.

L'essence de Bergamotte est riche en esters, 30 à 45 % exprimés en acétate de linalyle, d'après GORIS.

Les essences de Citron et d'Orange (essence de Portugal) donnent une réaction d'intensité faible, mais dont la mesure est gênée par l'apparition d'un trouble quand on ajoute la solution alcaline d'hydroxylamine. Des modifications apportées à la technique pourraient peut-être améliorer le rendement de la réaction dans ce cas, qui d'ailleurs ne paraît pas intéressant étant donné la minime intensité de la coloration obtenue.

L'essence de Cannelle donne une coloration intense. Si elle est riche en aldéhyde cinnamique, elle renferme aussi des esters, notamment l'isobutyrate de linalyle. L'aldéhyde cinnamique, bien que susceptible de se combiner avec l'hydroxylamine, ne donne pas la réaction colorée par $Fe\,Cl_3$ après action de l'hydroxylamine alcaline. Une étude complémentaire est donc nécessaire pour déterminer quels constituants sont responsables de la réaction intense que donne cette essence.

Dans le cas de l'essence de Menthe poivrée, nous avons procédé à des essais sur deux échantillons de provenance différente, l'un ne donnait aucune coloration notable, l'autre une coloration de l'ordre de 75 degrés Meunier. Cette coloration modérée correspond à une assez faible quantité d'esters. D'après GORIS, la teneur de l'essence de Menthe en acétate de menthyle varie de 3 à 25 % suivant la provenance.

Là aussi, il serait intéressant d'établir des courbes comparatives avec comme témoin une solution d'acétate de menthyle, pour doser de façon précise la concentration en esters des essences de Menthe.

Dans le cas de l'essence de Girofle, qui nous donne une coloration relativement importante, il semble que l'acétyleugénol en soit responsable. Cependant, il faut considérer que l'eugénol lui-même, par sa fonction phénolique libre, donne par le $Fe\,Cl_3$ une coloration verte qui vient se surajouter à celle que donne son

ester acétique dans la réaction provoquée par l'hydroxylamine et Fe Cl_3. Il paraît donc possible d'appliquer cette réaction à l'essence de Girofle en utilisant un essai effectué sur l'essence additionnée de la seule solution de Fe Cl_3, et un essai par la réaction hydroxamique Fe Cl_3. La comparaison du premier avec une solution étalon d'eugénol, la comparaison du second avec une solution d'acétyleugénol, le zéro étant fait avec l'essai à Fe Cl_3 seul, peut permettre le dosage de l'acétyleugénol.

Résultats du deuxième groupe.

Nos essais ont porté sur plusieurs échantillons d'essences de Lavande, de Lavandin, d'Aspic, et sur un échantillon d'acétate de linalyle.

TABLEAU X

Intensité de la coloration pour une prise d'essai de 10 mg.	degrés Meunier	D.O.
	—	—
Essence de Lavande (échantillon I).....	185	0,57
— Lavande (— II).....	140	0,43
— Lavande (— III).....	200	0,62
— Lavandin (échantillon I).....	110	0,34
— Lavandin (— II).....	50	0,15
— Aspic.	40	0,12
Acétate de linalyle.....	300	0,91

Nous donnons sous forme de graphique les résultats obtenus avec une essence de Lavande, une essence de Lavandin, une essence d'Aspic et, à titre de référence, l'acétate de linalyle à diverses concentrations de 1 à 10 mg.

A signaler que, dans le cas de l'essence d'Aspic, la dilution a dû être effectuée dans l'alcool absolu pour dissoudre le précipité formé lors de l'addition des réactifs.

(1) ACETATE DE LINALYLE
(2) ESSENCE DE LAVANDE
(3) ESSENCE DE LAVANDIN
(4) ESSENCE D'ASPIC
INTENSITE DE LA COLORATION EN DEGRES ELECTROPHOTOMETRIQUES MEUNIER
FILTRE VERT 520 mμ, CUVE DE 1 cm.
300
250
200
150
100
50
(1)
(2)
(3)
(4)
CONCENTRATION DE LA SUBSTANCE
1 mg
2 mg
5mg
10 mg

FIG. 8.

En prenant comme référence la courbe tracée pour l'acétate de linalyle, on peut établir les valeurs suivantes en esters totaux pour les divers échantillons étudiés.

TABLEAU XI

Essence de Lavande n° I.	60 %
— Lavande n° II.	46 %
— Lavande n° III.	66 %
— Lavandin n° I.	33 %
— Lavandin n° II.	16 %
— Aspic.	13 %

Ces chiffres correspondent sensiblement à ceux admis dans la plupart des publications sur ce sujet, et particulièrement par le Codex qui admet comme minimum d'esters totaux 35 % pour l'essence de Lavande et 16 % pour l'essence de Lavandin.

Conclusion.

On voit que la réaction colorée à l'hydroxylamine et $FeCl_3$ peut permettre le dosage facile et rapide des esters totaux des essences pour des prises d'essai de l'ordre de quelques milligrammes. Elle peut présenter un grand intérêt pratique dans l'industrie des essences, notamment pour celles dont la valeur est fonction de leur teneur en esters.

Chapitre VII

ESTERS PHÉNOLIQUES ET DÉRIVÉS SALYCILÉS

A côté des esters portant sur la fonction alcool, les esters de phénol peuvent aussi être l'objet d'application de la réaction à l'hydroxylamine. Il nous a paru intéressant d'étudier les résultats susceptibles d'être obtenus par l'usage de cette réaction dans le cas des dérivés salicylés d'usage pharmaceutique, comme le salol, l'acide succinyldisalicylique, l'acide acétylcrésotinique, le benzonaphtol et surtout l'un des esters salicylés les plus employés en pharmacie, l'acide acétylsalicylique, la banale « aspirine ». Nous y avons joint, à titre de référence, l'étude des esters acétiques du phénol et du naphtol.

Technique.

Nos essais ont porté sur :

1° *Aspirine.*

Deux solutions d'aspirine, toutes deux à la concentration de 2 ‰ :

— l'une en solution tampon de pH 7,4, véronal-véronal sodique,

— l'autre en solution dans l'alcool absolu.

La réaction est faite sur des prises d'essai de 1 cm^3 contenant des quantités d'aspirine allant de 2 mg à 0,2 mg.

2° *Acide succinyldisalicylique* (*salisuccyl*) [1]

Ce produit a été dissous dans l'alcool, de manière à avoir une solution à 5 ‰ ; la réaction a été faite pour 1 cm^3 de solution alcoolique contenant donc 5 mg.

3° *Salicylate de phényle* (*salol*).

La solution de ce corps a été faite à froid à 5 ‰ dans l'alcool absolu.

4° *Acide acétylcrésotinique* (*crésopyrine*).

Solution à 5 ‰ dans l'alcool à chaud.

A 1 cm^3 de chacune des solutions, nous avons ajouté 0,4 cm^3 de solution alcaline d'hydoxylamine, puis, après avoir agité et laissé en contact environ deux minutes, 0,3 cm^3 d'HCl 4M, puis 0,2 cm^3 de solution ferrique, la dilution était faite avec l'eau (seul le salol doit être dilué avec de l'alcool à 70 degrés).

Par ailleurs, nous avons utilisé comme témoins, pour chaque corps étudié :

a) un tube contenant les réactifs et 1 cm^3 d'alcool à 95 degrés ;

b) un tube contenant 1 cm^3 de solution étudiée plus 0,2 cm^3 de solution ferrique. Ceci pour vérifier la présence éventuelle d'acide salicylique libre dans la solution d'aspirine ou de salol ; l'on sait qu'avec le perchlorure de fer, l'acide salicylique donne une intense coloration violette, qui se surajoute à la coloration finale et fausse le dosage ;

---

(1) Nous remercions bien vivement les Laboratoires BOUILLET et les Laboratoires STÈNE qui nous ont aimablement fourni le salisuccyl et la crésopyrine.

c) un tube dans lequel on a remplacé l'addition de la solution alcaline d'hydroxylamine par de la soude 3,5 M diluée pour un tiers par de l'eau distillée.

5° *Les corps suivants :* phénylacétyle, benzonaphtol, acétate d'α-naphtyle, ont été mis en solution dans l'alcool absolu, de manière à obtenir une concentration à 5 ‰.

La lecture était faite à l'électrophotomètre Meunier ou au spectrophotomètre Jobin-Yvon, filtre vert 520 mμ, cuve de 1 cm.

Dans le cas particulier de l'aspirine, il nous a semblé préférable d'opérer sur la solution dans l'alcool absolu.

Résultats.

TABLEAU XII

INTENSITÉ DE LA COLORATION POUR UNE PRISE D'ESSAI DE 5 MG.

	D.O.	degrés Meunier
	—	—
Acide acétylsalicylique	5,00	1610
Acide succinyldisalicylique	4,30	1380
Salicylate de phényle	2,50	805
Acide acétylcrésotinique	1,80	580
Benzonaphtol	1,90	610
Phénylacétyle	2,40	775
Acétate d'α-naphtyle	2,20	710

C'est une coloration jaune brun qui apparaît initialement par addition de $FeCl_3$ en milieu alcoolique, mais elle devient rouge violacé par dilution avec l'eau (ou l'alcool pour le salol).

Dans le cas de l'aspirine, du salol, de l'acide succinyldisalicylique, la réaction est fortement positive ; elle est moins intense pour l'acide acétylcrésotinique (crésopyrine).

Cette coloration rouge violacé apparaissant dans les essais comportant l'addition d'hydroxylamine, est nette-

ment différente de la teinte plus franchement violette qui se produit dans les témoins effectués avec la seule action de la soude :

1° *Avec l'acide acétylsalicylique* (*aspirine*). — Dans le premier cas, on dose l'ensemble des colorations dues à l'acide acétylhydroxamique formé et à l'acide salicylique libéré et, dans le second cas, seulement l'acide salicylique libéré sous l'influence de l'hydrolyse alcaline. Il faut noter aussi que, dans les essais sans hydroxylamine, la coloration jaune ne passe au violet que par la dilution dans l'eau.

2° *Avec le salicylate de phényle* (*salol*). — Dans le premier cas, la coloration obtenue est très intense, de l'ordre de 2,5 D.O. On dose en effet l'acide salicylique libéré, mais aussi, semble-t-il, un acide phénylhydroxamique. Dans le second cas, on dose l'acide salicylique libéré sous l'influence de la soude seule.

3° *Avec l'acide succinyldisalicylique* (*salisuccyl*). — Dans les deux cas, la coloration est très intense, mais, chose remarquable, d'égale intensité, de l'ordre de 4,5 D.O. Il semble donc ici que l'intensité de la coloration soit due à l'action de la soude sur les deux molécules d'acide salicylique, et qu'il ne se forme pas dans le premier cas un acide succinylhydroxamique qui puisse donner la réaction colorée caractéristique.

4° *Avec l'acide acétylcrésotinique* (*crésopyrine*). . . Ici encore, dans les deux cas, la coloration est relativement intense, mais nettement moins que pour les corps étudiés plus haut.

La différence entre le dosage avec l'hydroxylamine et celui avec la soude seule, est peu importante.

A la lumière des chiffres obtenus, on observe que la différence des résultats entre le dosage par l'hydroxylamine et celui par la soude seule n'est pas très marqué dans les cas du salisuccyl.

La réaction à l'hydroxylamine n'apporte pas une sensibilité beaucoup plus grande au dosage colorimétrique de ces dérivés salicylés. Il nous paraît plus simple de doser par colorimétrie à l'aide de $Fe\,Cl_3$ l'acide salicylique libéré par hydrolyse alcaline. C'est ainsi que nous avons effectué cette dernière réaction sur une prise d'essai de 2 mg d'acide salicylique par centimètre cube, en faisant des dilutions allant de 2 mg à 0,2 mg par centimètre cube en solution dans l'alcool, par addition de 0,4 cm^3 de la solution alcaline d'hydroxylamine ; puis, après environ deux minutes, 0,3 cm^3 d'HCl 4M, 0,2 cm^3 de solution ferrique et enfin 5 cm^3 d'eau distillée. Nous avons obtenu une courbe qui correspond exactement avec celle obtenue par action sur l'aspirine de la soude sans hydroxylamine, si l'on rapporte au poids moléculaire de l'aspirine.

A noter que, lorsqu'on laisse agir la solution alcaline d'hydroxylamine pendant un temps d'environ trente minutes, la coloration dans ces cas étudiés n'est pas plus intense, alors que, dans l'autre cas, comme nous l'avons vu par exemple pour les alcaloïdes, elle augmente d'une façon très notable.

Ces quelques essais d'application de la réaction à l'hydroxylamine et au chlorure ferrique au dosage de quelques dérivés salicylés, nous montrent qu'elle donne une intensité de coloration très forte, mais la différence est relativement peu marquée avec celle qu'on obtient si l'on utilise simplement l'action de la soude à froid, et le dosage par le $Cl_3\,Fe$ de l'acide salicylique libéré ; elle n'apporte donc pas d'avantage très important, quoique la sensibilité soit à peu près augmentée de 40 % dans le cas de l'aspirine.

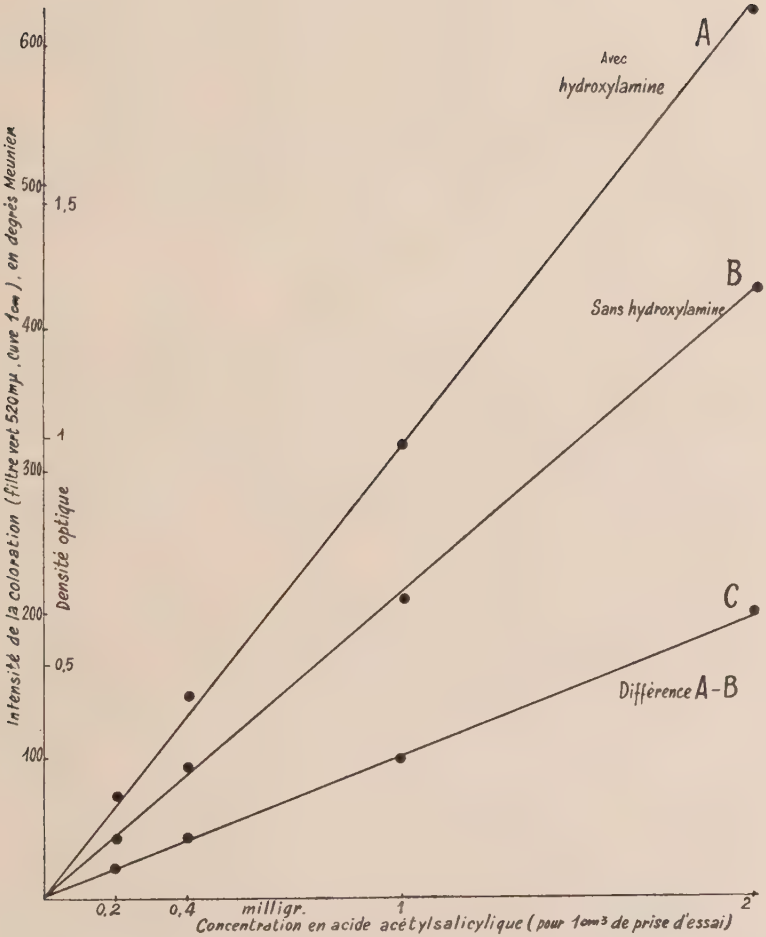

A
Avec
hydroxylamine
B
Sans hydroxylamine
C
Différence A-B
Intensité de la coloration (filtre vert 520mμ, cuve 1cm), en degrés Meunier
Densité optique
600
500
400
300
200
100
1,5
1
0,5
0,2
0,4
milligr.
1
2
Concentration en acide acétylsalicylique (pour 1cm3 de prise d'essai)

FIG. 9.

Chapitre VIII

ESTERS D'ACIDES GRAS.

L'application de la réaction à l'hydroxylamine chlorure ferrique aux esters d'acides gras, a été maintes fois effectuée. Bauer et E. Hirsch [5] ont décrit en 1949 une technique basée sur le principe de la réaction hydroxamique appliquée au dosage des acides gras estérifiés totaux du sérum, méthode qui a été modifiée et simplifiée par Jarrier et Polonowski [24] et par Rapport et Alonzo [42].

Nous avons pensé qu'il serait digne d'intérêt de faire une étude analytique systématique de nombreux esters d'acides gras, et aussi de quelques lipides naturels.

Technique.

Pour nos essais, les lipides étudiés ont été mis en solution dans l'alcool à 95 degrés, de façon à obtenir des solutions à 5 ‰.

La réaction était faite sur 1 cm^3 de solution, soit sur 5 mg de substance. La technique suivie est celle déjà décrite. Cependant, ici, nous laissons agir l'hydroxylamine pendant trente minutes, car l'hydrolyse alcaline ne s'effectue que progressivement, le maximum de la réaction étant atteint après le délai de trente minutes. La dilution finale se fait avec de l'alcool à 70 degrés, ce qui en général évite toute turbidité.

Résultats.

Nous donnons, dans le tableau suivant, les résultats, en degrés Meunier et en D.O., obtenus dans les conditions indiquées plus haut pour une prise d'essai de 5 mg, à l'électrophotomètre Jobin-Yvon ou Meunier, cuve de 1 cm, filtre vert 520 mμ. Les intensités de coloration étant souvent extrêmement fortes, on diluait par de l'alcool à 70 degrés pour la lecture, en tenant compte évidemment de cette dilution dans le calcul final, la densité optique correspondant aux 5 mg de prise d'essai.

TABLEAU XIII

Intensité de la coloration obtenue pour une prise d'essai de 5 mg.

Esters d'acides gras (1)	D.O.	degrés Meunier
—	—	—
Triacétine	4,96	1600
Tributyrine	4,10	1300
Tricaproïne	2,80	900
Trilaurine	1,49	480
Trimyristine	1,40	450
Trioctanine	2,00	645
Trioléine	1,24	400
Tripalmitine	1,10	350
Tris'éarine	0,71	230
Lécithine (2)	1,70	550
Ethylacétate	4,96	1600
— butyrate	2,00	650
— chaulmoograte	1,11	360
— palmitate	1,17	380
— myristate	1,90	620
— propionate	1,86	600
— ricinoléate	2,45	790
— stéarate	1,05	340
Oléate de cholestérol	0	0
Palmitate de cholestérol	0	0
Acétate de cholestérol	1,15	360

(1) Nous remercions bien vivement M. le docteur Le Bideau, de la Société Astra, grâce à qui nous avons pu obtenir certains

Tous les esters glycérides d'acides gras donnent avec l'hydroxylamine une réaction dont l'intensité peut varier dans une grande amplitude, puisqu'elle va des 230 degrés Meunier donnés par la tristéarine, aux 1600 degrés Meunier donnés par la triacétine. Les esters éthyliques donnent aussi des réactions intenses, le maximum étant observé pour le ricinoléate d'éthyle.

Pour le groupe des esters du cholestérol, HESTRIN [17] signalait que ceux-ci ne donnaient pas la réaction hydroxamique. Il laissait la solution en contact avec l'hydroxylamine alcaline pendant environ quatre minutes. Nous avons laissé en contact trente minutes, comme pour les autres esters d'acides gras, et c'est ainsi que l'acétylcholestérol donne alors une réaction hydroxamique caractéristique ; la coloration rouge obtenue étant de l'ordre de 300 degrés Meunier. Cependant, le palmitate de cholestérol ne donne, lui, aucune coloration.

Pour ce qui concerne les glycérides et les esters éthyliques, l'intensité de la coloration obtenue paraît fonction de :

1° *La force de la liaison ester.*

Il est évident que la liaison ester éthyl - acide semble se rompre plus facilement que les trois fonctions ester glycérol - acide : en effet, l'éthylstéarate donne une coloration de l'ordre de 340 degrés Meunier, soit une densité optique de 1,05, alors que le glycérol tristéarate, qui présente, lui, trois fonctions ester, ne donne une coloration que de l'ordre de 230 degrés Meunier, soit

---

échantillons purs d'esters d'acides gras, nécessaires à ces recherches.

(2) Lécithine d'œuf. Nous adressons nos remerciements à M. le professeur Jacques POLONOWSKI, qui a eu l'amabilité de nous confier cet échantillon de lécithine pure.

une D.O. de 0,71. Ce qui montre que, dans un même corps possédant plusieurs fonctions ester, celles-ci n'ont pas la même force ; dans le cas du glycérol, il est probable que c'est la fonction alcool secondaire qui rompt la première sa fonction ester ; on sait d'ailleurs aussi que les liaisons ester des triglycérides ne se laissent pas rompre également par les enzymes lipolytiques.

2° *La saturation de la chaîne de l'acide gras.*

Il semblerait que ce sont les esters d'acides gras non saturés qui, à longueur de chaîne égale, donnent la coloration la plus intense. C'est ainsi que le ricinoléate d'éthyle donne une coloration de l'ordre de 2,45 en densité optique, alors que le stéarate d'éthyle ne donne qu'une coloration de l'ordre de 1,05. Le chaulmoograte d'éthyle, ayant une double liaison sur sa partie cyclique, donne un résultat légèrement supérieur au stéarate d'éthyle.

La question de l'influence de la structure moléculaire des divers esters d'acides gras sur l'intensité de la réaction, apparaît donc complexe et mérite de plus amples recherches, que nous n'avons pu envisager ici, dans le cadre de notre étude.

Applications a quelques huiles naturelles.

Nous avons par ailleurs effectué quelques essais sur des huiles d'olive, d'arachide, de ricin, d'amandes douces, de germes de blé et de foie de morue. Nous avons opéré sur des solutions alcooliques à 5 ‰ ; nous laissons agir l'hydroxylamine alcaline pendant trente minutes.

TABLEAU XIV

INTENSITÉ DE LA COLORATION POUR UNE PRISE D'ESSAI DE 5 MG.

	D.O.	degrés Meunier
	—	—
Huile d'olive	0,51	165
— de ricin	1,78	575
— d'amandes	0,45	146
— d'arachides	0,65	210
— de foie de morue	0,87	280
— de germe de blé (1)	0,94	335

(1) Produit commercial *Vita Food.*

Notons que les huiles étudiées, même à la concentration de 5 mg par centimètre cube, se dissolvent avec quelques difficultés dans l'alcool. Il semble qu'il faudrait trouver un solvant plus approprié qui évite d'émulsionner.

Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus correspondent en général assez bien aux dosages des esters en solutions pures. C'est ainsi que l'huile de ricin donne une coloration intense : 575 degrés Meunier, comme l'ester éthylique de l'acide ricinoléique lui-même donne une réaction extrêmement forte par rapport aux autres esters éthyliques d'acides gras. La coloration obtenue pour chaque huile correspond bien grossièrement à celle obtenue pour l'ester particulier, encore que des études plus approfondies soient nécessaires pour le préciser.

APPLICATION AU GLYCÉROL.

Le Codex, dans les essais prescrits sur la glycérine pharmaceutique, ne fait pas mention de la recherche ni du dosage des esters. Or, les glycérines commerciales contiennent toutes des proportions considérables d'esters, et même les plus pures en renferment encore des quantités faibles, mais notables, dont le maximum admis est indiqué par les fabricants.

Technique.

La réaction est faite sur 1 cm^3 de solution de glycérol dans l'alcool à 50 degrés. Il faut préciser ici qu'on laisse l'hydroxylamine alcaline agir pendant environ une minute, enfin, on ajoute 5 cm^3 d'alcool à 50 degrés. La lecture est faite à l'électrophotomètre, cuve de 1 cm. filtre vert de 520 mμ.

Résultats.

Nos essais ont porté sur plusieurs échantillons commerciaux de glycérine, depuis le produit pur jusqu'à la glycérine employée de manière courante à l'officine. Nous avons donc utilisé des solutions de glycérine dans l'alcool à 50 degrés, de façon à obtenir des prises d'essai de 400 mg par centimètre cube. Comme solution de référence pour le dosage des esters, nous avons utilisé une solution de tributyrine pure à 1 % dans l'alcool à 50 degrés, en faisant des dilutions allant de 1 mg à 0,1 mg par centimètre cube.

La relation entre la coloration rouge obtenue et la concentration en tributyrine se traduit par une droite dans les limites de concentrations utilisées.

Les intensités de coloration obtenues pour les divers échantillons étudiés sont les suivantes (en degrés Meunier), pour une prise d'essai uniforme de 400 mg de glycérol :

TABLEAU XV

	degrés Meunier
Glycérol Merck pur « pro analysi »	20
Glycérol officinal : échantillon 1	182
— 2	120
— 3	230
— 4	267

ce qui correspond respectivement aux concentrations en esters (en tributyrine) :

TABLEAU XVI

Glycérol Merck pur « pro analysi »	0,017 %
Glycérol officinal : échantillon 1	0,175 %
— 2	0,115 %
— 3	0,221 %
— 4	0,252 %

FIG. 10.

On voit donc par ces résultats que, même dans l'échantillon le plus pur, la quantité d'esters est encore considérable. Dans le cas du glycérol bidistillé « pro analysi » Merck, la quantité d'esters annoncée par le fabricant doit être au maximum de 0,07 %. L'échantillon analysé par notre technique correspond donc à cette exigence.

Les échantillons commerciaux de glycérol officinal renferment des quantités d'esters au moins dix fois plus fortes.

Chapitre IX

DIVERS

Nous avons rassemblé dans ce chapitre une brève étude portant, d'une part, sur quelques esters choliniques et, d'autre part, sur quelques substances de constitution lactonique, substances pour lesquelles la réaction à l'hydroxamine - $FeCl_3$ paraît pouvoir être appliquée.

1° Esters choliniques.

Nous avons étudié dans ce groupe les esters les plus courants : l'acétylcholine [17, 47], l'acétyl-β-méthylcholine, la benzoylcholine, la n-butyrylcholine, la propionylcholine, la succinylcholine, la carbaminoylcholine, la nitrocholine, la phosphorylcholine, et nous y avons joint la bétaïne, produit d'oxydation de la choline.

Technique.

Pour chacun des esters de la choline, nous avons utilisé des prises d'essai de 1 cm^3 de solution à 2 ‰ dans l'eau distillée, soit 2 mg. Nous avons laissé agir l'hydroxylamine alcaline pendant environ deux minutes, puis ajouté HCl et la solution ferrique, la dilution finale était faite avec 5 cm^3 d'eau distillée.

Résultats.

TABLEAU XVII

INTENSITÉ DE LA COLORATION POUR UNE PRISE D'ESSAI DE 2 MG.

	D.O.	degrés Meunier
	—	—
Acétylcholine chlorure	1,00	324
Acétyl-β-méthylcholine chlorure	0,93	300
Benzoylcholine chlorure	1,02	330
Butyrylcholine chlorure	0,65	210
Propionylcholine chlorure	0,65	210
Succinylcholine chlorure (1)	0,50	162
Carbaminoylcholine chlorure	0	0
Nitrocholine chlorure	0	0
Phosphorylcholine chlorure	0	0
Bétaïne chlorure	0	0

La réaction colorée à l'hydroxylamine chlorure ferrique donne, avec la plupart des esters de la choline, une coloration intense. Il est à remarquer que la coloration est rouge pour l'acétylcholine et l'acétyl-β-méthylcholine, et violette pour la benzoylcholine. L'acétylcholine, l'acétyl-β-méthylcholine et la benzoylcholine donnent les colorations les plus intenses, puis viennent la butyrylcholine, la propionylcholine et la succinylcholine. Certains esters, comme la carbaminoylcholine, la nitrocholine, la phosphorylcholine, ne donnent aucune coloration.

La réaction hydroxamique est particulièrement intéressante dans le cas de l'acétylcholine, comme l'ont montré déjà de nombreux travaux : HESTRIN [17], et particulièrement ceux du professeur D. VINCENT [47] qui a bien montré la proportionnalité entre la concentration en acétylcholine et la coloration obtenue, et l'utilité de cette réaction dans l'étude de la conservation des solutions d'acétylcholine, selon le vieillissement et le temps de stérilisation.

(1) Produit obligeamment fourni par les Laboratoires ROBERT et CARRIÈRE (Succicholine).

Il est à remarquer que cette réaction est aussi utilisée pour le dosage des cholinestérases (La Huerga, Yesinick et Popper, Vincent et Segonzac).

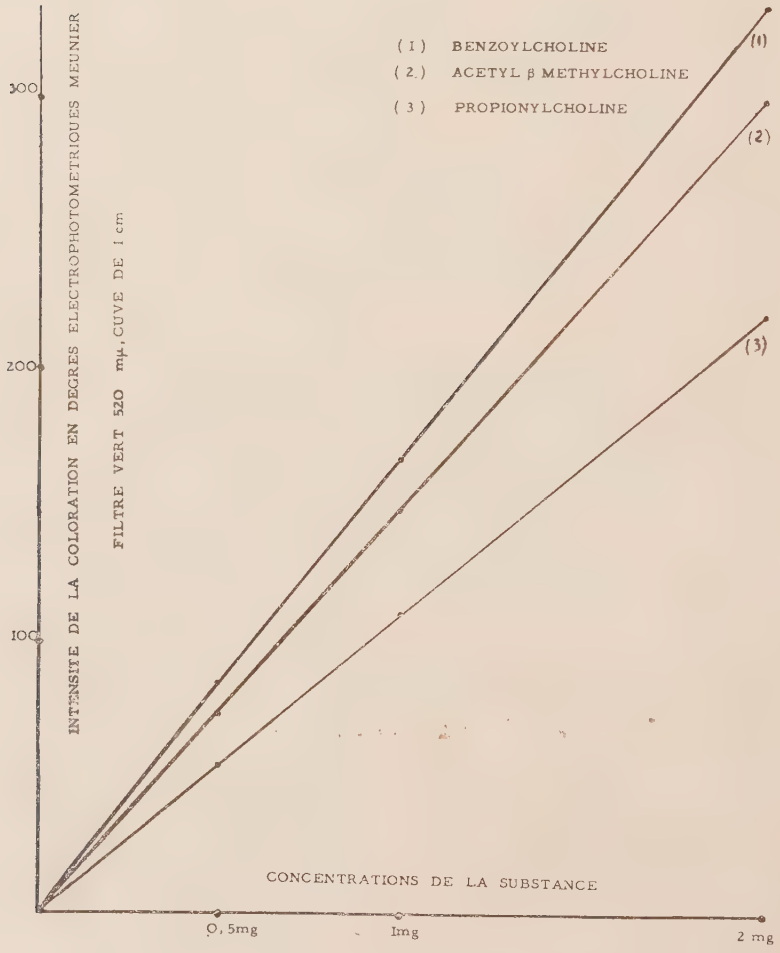


Fig. 11.

2° Substances a fonction lactonique.

A ce propos, nous avons déjà étudié la pilocarpine dans notre chapitre se rapportant aux alcaloïdes. Nous y ajouterons ici, de façon très sommaire, quelques essais effectués sur la santonine, la picrotoxine, l'absinthine, l'hélénine, auxquelles nous avons ajouté l'acide ascorbique, qui est de structure lactonique.

Nous avons étudié des solutions à 5 ‰ dans l'alcool à 95 degrés, et les essais étaient faits sur 1 cm^3, soit 5 mg. Le temps de contact avec l'hydroxylamine alcaline était de deux minutes et la dilution finale se faisait par 5 cm^3 d'alcool à 70 degrés, sauf dans le cas de l'acide ascorbique où la solution était faite dans l'eau et où l'on diluait finalement par 5 cm^3 d'eau distillée.

TABLEAU XVIII

Intensité de la coloration pour une prise d'essai de 5 mg.

	D.O.	degrés Meunier
	—	—
Santonine	0,30	97
Absinthine	0,70	225
Picrotoxine	1,85	595
Hélénine (1)	0,20	64
Acide ascorbique	0,28	90

La picrotoxine donne la coloration d'intensité maximum, sans doute par ouverture du cycle lactonique et formation d'un acide picrotoxinique hydroxamique. La réaction est encore très intense avec l'absinthine et la santonine. Dans le cas de cette dernière substance, il se forme sans doute le dérivé hydroxamique de l'acide santoninique. L'hélénine (de l'essence d'Aunée), formée

(1) Produit obligeamment fourni par les Laboratoires Houdé.

d'alantolactone et d'isoalantolactone, donne moins intensément la réaction, qui est encore considérable.

Le cas de l'acide ascorbique est assez particulier. En effet, HESTRIN [17] a indiqué qu'il donnait une réaction négative. Nos essais nous ont montré qu'une coloration rose très fugace apparaît lors de l'addition de la solution ferrique, selon la technique habituelle, mais que si l'on ajoute un excès de solution ferrique, la coloration rose persiste et peut être mesurable. L'essai ci-dessus correspond à l'addition de 0,6 cm^3 de solution ferrique au lieu des 0,2 cm^3 habituels.

Malgré le petit nombre de substances lactoniques étudiées ici, nous pouvons tout de même affirmer que la réaction à l'hydroxylamine chlorure ferrique peut être éventuellement appliquée à l'étude et au dosage de ces produits naturels et que, de ce côté aussi, son champ d'application peut encore être utilement étendu.

CONCLUSIONS

D'une grande simplicité d'exécution, la réaction à l'hydroxylamine chlorure ferrique met en jeu la formation d'acides hydroxamiques par l'action de l'hydroxylamine, en milieu alcalin, sur les esters et, plus accesssoirement, sur les lactones, le dérivé hydroxamique formé donnant, en milieu acide, un complexe ferrique coloré habituellement en rouge violacé. Pour une large gamme de concentration, l'intensité de la coloration est quantitative et permet un dosage facile et très précis. Les recherches rapportées dans cette thèse nous ont permis de constater combien cette réaction peut être précieuse pour l'étude analytique, la diagnose et le dosage de nombreuses substances d'intérêt pharmaceutique.

Dans le domaine des *alcaloïdes*, la réaction hydroxamique possède un vaste champ d'applications. Nous avons pu étudier vingt-huit alcaloïdes esters et vingt-neuf alcaloïdes non pourvus de fonction ester. Parmi les premiers, certains, comme l'héroïne, l'aconitine, la cocaïne, la benzoylecgonine, l'arécoline, la protovératrine, se distinguent par une coloration intense. Par contre, d'autres, comme les alcaloïdes du groupe tropique, donnent une réaction plus faible. D'autres donnant une réaction pratiquement nulle, dans nos conditions expérimentales, en solution aqueuse et avec un temps réduit de contact avec l'hydroxylamine alcaline.

peuvent, si l'on opère en solution alcoolique et si l'on prolonge le temps de contact, donner lieu à une réaction positive utilisable pour le dosage : réserpine, alcaloïdes du groupe de la yohimbine.

Nous avons pu constater que l'ésérine et la généséríne se signalent par une réaction colorée d'une extrême intensité, mais donc le mécanisme ne paraît pas répondre à celui de la réaction hydroxamique classique. Dans le second groupe, celui des alcaloïdes sans fonction ester, presque tous les alcaloïdes étudiés donnent une réaction négative. Il faut cependant signaler le cas particulier de la pilocarpine donnant une intense coloration rouge liée sans doute à une réaction hydroxamique typique par ouverture du cycle lactonique, tandis que l'apomorphine provoque une coloration brun rouge qui, elle, paraît répondre à un mécanisme différent.

Dans le groupe des *hétérosides cardiotoniques*, une application particulièrement intéressante concerne les hétérosides acétylés (lanatosides, acétyldigitoxoside oléandroside, scilliroside, tanghinoside), qui donnent une coloration intense, alors que les hétérosides dépourvus de groupe acétyle réagissent beaucoup plus faiblement, mais cependant nettement, sans doute par ouverture du cycle lactonique et formation d'un dérivé hydroxamique.

La réaction à l'hydroxylamine est aussi facilement applicable à certains *antibiotiques*, notamment les pénicillines par leur groupe lactame, et certains de leurs dérivés ou associations utilisées en thérapeutique : tels le pénicillinate de procaïne, l'érythromycine et ses esters, la triacétyloléandomycine.

Dans le groupe des *hormones stéroïdes*, la réaction est intéressante à considérer à propos des esters stéroïdes, qui en solution alcoolique donnent parfaitement la réaction hydroxamique, qui permet de distinguer avec

une grande facilité les esters des hormones elles-mêmes (cortisone et acétylcortisone, désoxycortisone et acétyl-désoxycortisone, hémisuccinyl-hydrocortisone, oestradiol et benzoyloestradiol, prégnénolone et acétylprégnénolone, testostérone et acétyltestostérone).

Le groupe des *esters phénoliques* s'est lui aussi révélé intéressant, les substances étudiées (acide acétylsalicylique, acide acétylcrésotinique, salicylate de phényle, phénylacétyle, benzonaphtol, acétate de naphtyle) peuvent être dosées par cette méthode, qui pourtant n'apporte pas, comme nous l'avons observé dans le cas de l'aspirine, une augmentation très grande de sensibilité par rapport à celle qui consiste à doser simplement par le perchlorure de fer, le phénol libéré par la seule action de la soude.

L'étude de quelques *essences* peut bénéficier de l'usage de cette réaction. Son intérêt majeur consiste, dans le cas particulier des essences de Lavande, de Lavandin, d'Aspic, à permettre d'en doser facilement les esters (acétyl-linalol).

Les *esters d'acides gras* (glycérides) donnent très intensément la réaction, à condition toutefois de prolonger le temps de contact entre l'ester et l'hydroxylamine alcaline. Dans ces conditions, elle est parfaitement applicable à leur dosage et à l'étude des corps gras naturels. On constate toutefois que la réaction reste négative dans le cas de certains esters du cholestérol.

Nous avons étudié spécialement le cas de divers esters de la choline pour lesquels cette réaction a été déjà largement employée. Enfin, certaines substances lactoniques (santonine, picrotoxine, hélénine) nous ont montré que la réaction peut être utile pour leur diagnose ou leur dosage.

La réaction à l'hydroxylamine chlorure ferrique, par l'éventail largement ouvert de ses possibilités, peut per-

mettre l'étude analytique, le dosage, l'indice de conservation de nombreuses drogues pharmaceutiques, et cela justifie amplement l'intérêt qu'elle a suscité.

Dans ce travail, nous avons surtout voulu montrer l'immense intérêt pratique de cette réaction. Si nous avons pu étudier, parfois avec quelques détails, certaines applications qui nous ont paru les plus intéressantes, pour d'autres secteurs, notre but n'aura été que d'ouvrir la voie à des recherches plus approfondies qui, sans nul doute, seront, plus tard, la base d'applications nouvelles en analyse pharmaceutique.

Le Président :
VINCENT

Vu : *Le Doyen,*
LAZORTHES.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Toulouse, le juin 1961
Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université.
DOTTIN.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDEL-AKER, SMITH F. — *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1951, *73*, 5859.
2. BAYER E., REUTHER Kh. — *Chem. Ber.*, 1956, *89*, 2541.
3. BAGGETT B., ENGEL L. L., FIELDING L. L. — *Journ. Biol. Chem.*, 1960, *235*, 2617.
4. BAYER E., REUTHER Kh., HEIDE Ter. — *Chem. Ber.*, 1957, *90*, 1929.
5. BAUER E., HIRSCH E. — *Arch. Bioch.*, 1949, *20*, 242.
6. BUCKLES R., THERLEU C. J. — *Anal. Chem.*, 1950, *22*, 676.
7. CHANTRENNE H. — *Trav. Labor. Carlsberg*, 1948, *26*, 231.
8. DIGGLE W. M., GAGE J. C. — *Analyst.*, 1953, *78*, 473.
9. DIGGLE W. — *Dansk. Tidsskr.*, 1954, *28*, 157-159.
10. DAVIDSON D. — *Journ. Chem. Educ.*, 1940, *17*, 81.
11. FEIGL F., ANGER V., FREHDEN O. — *Mikrochimie*, 1934, *15*, 9-23.
12. FINK W., FINK R. M. — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1949, *70*, 654.
13. FORD J. H. — *Anal. Chem.*, 1947, *19*, 1004.
14. FORIST A. A., THEAL S. — *Journ. Amer. Pharm. Assoc.*, 1958, *47*, 520.
15. FISHMAN-GOLDENBERG V., SPOERRI P. E. — *Ann. Chem.*, 1959, *31*, 1735.
16. FRÈREJACQUES M. — *C. R. Acad. Sc.*, 1955, *240*, 1804.
17. HESTRIN S. — *Journ. Biol. Chem.*, 1949, *180*, 249.
18. HILL U. — *Ind. and Eng. Chem. Annal.*, 1946, *18*, 317.
19. HILL U. — *Anal. Chem.*, 1947, *19*, 932.
20. GALLOPS. — *Journ. Biol. Chem.*, 1960, *235*, 2613.
21. GODDU R. F., LEBLANC N. F., WRIGHT C. M. — *Ann. Chem.*, 1955, *27*, 1251.
22. GOLDENBERG V., SPOERRI P. E. — *Ann. Chem.*, 1958, *30*, 1327.

23. GUAGNINI O. A., VOVESCH E. E. — *Mikrochim. Acta,* 1956, *1767.*
24. JARRIER M., POLONOWSKI J. — *Bull. Soc. Chimie Biol.,* 1955, *37,* 495.
26. KEENAU A. G. — *Chem. Process. ind.,* 1945, *29,* 857.
26. KENDAL L. P., RAMANATHAU A. N. — *Biochem. Journ.,* 1952, *52,* 430.
27. LIPPMANN F., TUTLE L. — *Journ. Biol. Chem.,* 1945, *159,* 21,
28. LIPPMANN F., TUTLE L. — — 1945, *161,* 415.
29. LIEN O. G. — *Ann. Chem.,* 1959, *31,* 1363.
30. LOSSEN W. — *Liebig Ann.,* 1877, *186,* 1.
30. LOSSEN W. — — 1889, *252,* 172.
32. LYNEN F., GRASSE M. — *H. S. Z. Physiol. Chem.,* 1958, *313,* 291.
33. MACCOMB E. A., MACCREACHY R. M. — *Ann. Chem.,* 1957, *29,* 819.
34. MATHIS F. — Thèse Doctorat ès Sciences, Paris, 27 mai 1952.
35. MAZOR L. — *Z. Annal. Chem.,* 1959, *170,* 98-103.
36. O'NEAL F. B., CARLTON J. — *Ann. Chem.,* 1958, *30,* 1051.
37. ODDO. — *Rec. Trav. chim.,* 1929, *48,* 875.
38. — *Berichte,* 1936, *69,* 287.
39. PEEL J. L. — *Biochem. Journ.,* 1951, *49,* 62.
40. PILZ N. — *Z. Ann. Chem.,* 1959, *166,* 189.
41. PESEZ M. — *Bull. Soc. Chim.,* 1960, 453.
42. RAPPORT M., ALONZO. — *Journ. Biol. Chem.,* 1955, *217,* 199.
43. ROSENTHAL H. L., PFLUKE M. L., CALLERANIS J. — *Clin. Chim. Acta,* 1959, *4,* 329.
44. TABARD A., CARRON M. — *Ann. Pharm. franç.,* 1949, *7,* 593.
45. SEIFTER S., GALLOP S. — *Journ. Biol. Chem.,* 1960, *235,* 2613.
46. THOMPSON A. R. — *Australian Journ. Sch. Res.,* 1950, *3 A,* 128.
47. VINCENT D., SEGONZAC G., VINCENT M. C. — *Ann. Pharm. franç.,* 1958, *16,* 179.
49. VINCENT D., SCHWAL H. — Société de Pharmacie de Toulouse, 19 mars 1959 ; *Ann. Pharm. franç.,* 1959, *17,* 237.
50. VINCENT D., SCHWAL H. — Société de Pharmacie de Toulouse, 28 mai 1959 ; *Ann. Pharm. franç.,* 1959, *17,* 553.
51. VINCENT D., SCHWAL H. — Société de Pharmacie de Toulouse, mai 1959 ; *Ann. Pharm. franç.,* 1959, *17,* 553.
52. VINCENT D., SCHWAL H. — *Ann. pharm.* 1959, *17,* 579.
53. VINCENT D., SCHWAL H. — *Ann. pharm.,* 1961, *19,* 73.
54. VINCENT D., SCHWAL H. — Société de Pharmacie de Toulouse, 29 janvier 1959 ; *Ann. Pharm. franç.,* 1959, *17,* 235.

55. VINCENT D., SCHWAL H. — Société de Pharmacie de Toulouse, 16 novembre 1959 ; *Ann. Pharm. franç.*, 1960, *18*, 173.

56. VINCENT D., SCHWAL H. — Société de Pharmacie de Toulouse, mai 1961.

57. VINESCH E., GUAGNINI O. A. — *Ann. Asoc. Quin. Arg.*, 1957, *45*, 84.

58. VINESCH E., GUAGNINI O. A. — *Mikrochim. Act.*, 1958, *1*.

59. WACHSMUTH H., KOECKOVEN L. — *Journ. Pharm. Belg.*, 1959, *14*, 456.

60. WACHSMUTH H., KOECKOVEN L. — *Journ. Pharm. Belg.*, 1959, *14*, 459.

61. WEINLAND R. F., BAIER G. — *Ber. Deutsch. Chem.*, 1920, *53*, 65.

62. WEINMANN S. H., JAYLE M. F. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, *39*, 65.

63. WOLLISCH E. C., SCHMALL M. — *Ann. Chem.*, 1950, *22*, 1033.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION. 11

CHAPITRE PREMIER.
Structure des acides hydroxamiques.
Leurs propriétés.
Mécanisme de la réaction à l'hydroxylamine.
Technique utilisée. 15

CHAPITRE II.
Alcaloïdes. 22

CHAPITRE III.
Hétérosides cardiotoniques 42

CHAPITRE IV.
Antibiotiques et notamment la Pénicilline 48

CHAPITRE V.
Hormones stéroïdes 56

CHAPITRE VI.
Essences. 60

CHAPITRE VII.
Esters phénoliques et dérivés salicylés 66

CHAPITRE VIII.
Esters d'acides gras 72

CHAPITRE IX.
Substances diverses. Esters choliniques 80

CHAPITRE X.
Conclusion. 85

BIBLIOGRAPHIE. 89

Imprimerie Toulousaine
Vve Lion
16, rue Lakanal, 16

Dépôt légal : 2e trim. 1961 — Aa 358